

## THESIS / THÈSE

### DOCTEUR EN SCIENCES

**Caractérisation agro-morphologique d'une collection de landraces péruviennes de pigeonpea (*cajanus cajan* L. Millsp.) pour l'analyse de sa diversité**

Bautista Salas, Ana Maria

*Award date:*  
2009

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FUNDP**

**Facultés des Sciences**

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Unité de Recherche en Biologie cellulaire et moléculaire Végétale

Rue de Bruxelles 61 B-5000 Namur – Belgique

Tél. +32(0)81724414

Fax. +32(0)81724382

pierre.vancutsem@fundp.ac.be

Site web : <http://www.fundp.ac.be/facultes/sciences/departements/biologie/recherche/centres/urbv>

**Caractérisation agro-morphologique et moléculaire  
d'une collection de *landraces* péruviennes de  
*pigeonpea* (*Cajanus cajan* L. Millsp.) pour l'analyse de  
sa diversité.**

Dissertation présentée par  
**Ana Maria BAUTISTA SALAS**  
En vue de l'obtention du grade  
de Docteur en Sciences

2009

Composition du jury :

Pr. Pierre BERTIN (UCL, Louvain-la-Neuve)  
Dr. Nicolas DAUCHOT (FUNDP – Namur)  
Pr. Olivier HARDY (ULB, Bruxelles)  
Pr. Johan MESSIAEN (FUNDP, URBV – Namur)  
Pr. Pierre VAN CUTSEM (promoteur, FUNDP – URBV – Namur)



**Caractérisation agro-morphologique et moléculaire d'une collection de  
*landraces* péruviennes de *pigeonpea* (*Cajanus cajan* L. Millsp.) pour  
l'analyse de sa diversité**

Par Ana Maria Bautista Salas

L'utilisation de la biodiversité dans le cadre de l'amélioration végétale présuppose une analyse des génotypes existants localement et adaptés à des environnements particuliers. Dans le cadre d'un projet d'amélioration du pois d'Angola ou *pigeonpea*, nous avons réalisé la prospection et la collecte de *landraces* du *pigeonpea* à *Lambayeque*, département au nord du Pérou. Par la suite, nous avons procédé à la caractérisation agro-morphologique des familles maternelles (issues de ces *landraces*) sur base des descripteurs. Parallèlement, nous avons effectué la caractérisation moléculaire de la collection ainsi que celles de certaines accessions indiennes et africaines à l'aide de marqueurs microsatellites que nous avons développés. Nous avons également utilisé des microsatellites fournis par l'ICRISAT. La caractérisation moléculaire est une étape importante, elle nécessite des outils précis, au coût peu élevé, performants et facilement utilisables. Un de ceux-ci : les microsatellites, marqueurs co-dominants. Grâce à ces sept marqueurs microsatellites, nous avons pu mettre en évidence la diversité au sein de la collection ainsi que le rapprochement entre le pool péruvien et africain. L'utilisation des techniques moléculaires comme les microsatellites s'avère importante car elle est complémentaire à celle des descripteurs. D'ailleurs son rôle est essentiel dans la valorisation des cultures d'avenir dans des pays comme le Pérou.

**Agro-morphological and molecular characterization of a Peruvian  
collection of *landraces* of *pigeonpea* (*Cajanus cajan* L. Millsp.) for the  
analysis of its diversity**

Par Ana Maria Bautista Salas

The use of biodiversity begins with an analysis of the existing genotypes adapted to a particular environment. Initially, we carried out the exploration and collection of *landraces* of the *pigeonpea* with *Lambayeque* located at the north of Peru. Then, we proceeded to the agro-morphological characterization of the maternal families (derived from these *landraces*) based on descriptors. In parallel, we undertook the molecular characterization of the collection as well as in some African and Indian accessions using microsatellites markers that we developed. We also used microsatellites provided by the ICRISAT. The molecular characterization is an important step that requires precise tools, relatively low cost, powerful and easy to use. One of those: Co-dominant microsatellites markers. Using these seven markers microsatellites, we were able to demonstrate the diversity within the collection as well as the proximity between the Peruvian and African group. The use of molecular techniques, such as the microsatellites, is important because it is complementary to that of the descriptors. Moreover their role in the valorisation of promising crops is essential in countries like Peru.



*A mes parents*



Au terme de ce doctorat, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont permis à ce travail de voir le jour.

Je remercie le Professeur Pierre Van Cutsem pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherche, pour la confiance qu'il m'a accordé depuis mon entrée dans son laboratoire, le suivi de ma formation et l'encadrement de la thèse.

Je remercie également le Professeur Felix Camarena Mayta co-promoteur de ce travail et toute l'équipe de PLGO de l'UNALM, Christian pour leur collaboration dans la mise en place des essais de caractérisation de la collection de *pigeonpea* à Lima, Pérou.

Je tiens également à remercier les Professeurs Olivier Hardy, P. Bertin et J. Messiaen ainsi que le Docteur Nicolas Dauchot, membres du jury, pour avoir accepté de faire partie du jury et avoir pris connaissance de ce travail.

J'aimerais également remercier Rajeev Varshney, de l'ICRISAT pour m'avoir fourni les amorces SSRs qui ont servi dans cette étude. Merci aussi au Dr Upadhyaya pour m'avoir fourni le germoplasme africain qui a été utilisé dans cette étude.

Je remercie également Olivier O. Dutrecq de DNALis sprl. pour nous avoir fourni le Kit *phytoPASS* qui nous a permis de prélever l'ADN de *pigeonpea*.

Merci aussi au Professeur Julian Chura de l'UNALM à la Molina pour son aide dans les analyses statistiques de données phénotypiques.

Mes remerciements s'adressent aussi au Blgo Msc. Angel Valldolid et son équipe de PROMENESTRAS IPEL, pour son aide précieuse au moment de la prospection et de la collecte du *pigeonpea* au Pérou.

Je remercie également Ing Msc Ricardo Chavarry de la Faculté d'Agronomie de l'Université Pedro Ruiz Gallo et ses étudiants Nicolay et Luis Miguel pour leur appui lors de la collecte de *pigeonpea* au Pérou.

Je tiens aussi à remercier le Secteur Social de la FUNDP et la Commission des étudiants étrangers en la personne de M. Honorez pour l'aide octroyée dans diverses circonstances qui m'ont permis de financer en partie mon séjour aux FUNDP.

Je tiens à remercier à la Maison de l'Amérique Latine Seul Asbl. en la personne de M. Wilson Machado qui a pris en charge mon dossier et qui m'a octroyé une aide financière pour la dernière année de mon doctorat.

Je remercie également tous les membres de l'URBV, présents et anciens pour leur présence quotidienne et leur participation directe ou indirecte à l'avancement de ce travail. Je tiens à remercier spécialement Nicolas pour sa patience et pour m'avoir appris ses « secrets de chercheur ».





Je tiens à remercier la Communauté Jésuite et le CRU qui m'ont entouré et servi de support moral tout au long de ces années. Un merci spécial au père Jean Jadot, pour ses nombreuses corrections du manuscrit et ses cours de français.

Je tiens à remercier aussi « mis amigos latinos »: Juan Carlos, Maria Piedad, William, Andrea, Eduardo et Rosse-Mary, pour les agréables moments passés et les longues soirées de discussions.

Je tiens à remercier le Service Culture – FUNDP, Madame Minet et mes étudiants du cours d'espagnol pour ce bel échange et pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens également à remercier tout particulièrement ma famille et ma belle famille pour leur soutien inconditionnel tout au long de ce doctorat. Merci toute spécialement à mes frères et soeurs pour leur soutien durant toutes ces années.

Un grand merci à toi, maman et papa, beaucoup de ce que je suis devenu dépend de vous. Je suis très fier de vous avoir comme parents et je m'en trouve chanceuse. Merci encore pour les heures/nuits passées à la vérification des évaluations des données à la Molina. Vous avez été mes yeux lors des évaluations au Pérou.

Je terminerai par remercier du fond du coeur celui qui a été à mes côtés aux moments les plus durs ainsi qu'aux plus beaux. Un grand merci à toi Christophe pour m'avoir soutenu par ta présence et ton aide au cours de ces années.



## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>1. Justification</b>	2
1.1 Description de la problématique socio-économique	2
1.2 Description de la problématique de l'amélioration génétique	3
<b>2. Les objectifs de la recherche</b>	5
<b>3. Plan de la thèse</b>	5
 <b>RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE</b>	
<b>1. Généralités de <i>pigeonpea</i></b>	7
1.1 Taxonomie, Origine et Pools génétiques	7
1.1.1 Taxonomie	7
1.1.1.1 Cytotaxonomie et hybridation	8
1.1.1.2 Taxonomie moléculaire	8
1.1.2 Origine et pools génétiques	9
1.1.2.1 Origine	9
1.1.2.2 Pools génétiques	10
1.1.2.2.1 Types de cultivars	11
1.2 Morphologie du <i>pigeonpea</i>	12
1.3 Ecologie et distribution du <i>pigeonpea</i>	13
1.4 Utilisations du <i>pigeonpea</i>	14
1.5 La culture du <i>pigeonpea</i>	15
1.5.1 Préparation du terrain	15
1.5.2 Les semis	15
1.5.3 Période de semis	15
1.5.4 Densité de semis	16
1.5.5 Entretien du <i>pigeonpea</i>	16
1.5.6 Récolte	16
1.5.7 Post récolte	16
1.5.8 Contraintes à la productivité du <i>pigeonpea</i>	17
1.6 Amélioration du <i>pigeonpea</i>	18
1.6.1 Objectifs d'amélioration	19
1.6.2 L'utilisation des parents sauvages du <i>pigeonpea</i>	19
1.7 Statistiques de production et de surface cultivée du <i>pigeonpea</i>	20
<b>2. <i>Pigeonpea</i> au Pérou</b>	22
2.1 L'introduction du <i>pigeonpea</i> dans la région nord du Pérou	24
2.1.1 L'hypothèse de Verschueren	24
2.1.2 La variabilité des <i>landraces</i> du <i>pigeonpea</i>	26
2.1.3 L'agriculture traditionnelle	26
2.1.4 Statistiques de production et de surface cultivée du <i>pigeonpea</i>	27

<b>3. Caractérisation de la variabilité de <i>pigeonpea</i></b>	28
3.1 Caractérisation phénotypique	28
3.1.1 Descripteurs	28
3.1.2 Descripteurs du <i>pigeonpea</i>	29
3.2 Caractérisation moléculaire	31
3.2.1 Marqueurs moléculaires	31
3.2.2 Simple Séquence Répétée (SSR)	33
3.2.2.1 Avantages des microsatellites	34
3.2.2.2 Désavantages des microsatellites	35
3.2.3 Caractérisation moléculaire en <i>pigeonpea</i>	35
3.2.3.1 Caractérisation moléculaire basée sur les microsatellites	36
3.2.3.2 Applications potentielles des marqueurs microsatellites chez le <i>pigeonpea</i>	36
<b>4. Analyse de la diversité génétique</b>	37
4.1 Diversité génétique	38
4.2 Erosion et conservation de la diversité génétique	38
4.3 Mesure de la diversité génétique et de la structure génétique	40
4.3.1 Equilibre Hardy-Weinberg	41
4.3.2 Diversité génétique intra-population	41
4.3.2.1 Les fréquences alléliques et génotypiques	41
4.3.2.2 L'hétérozygotie	42
4.3.2.3 Le pourcentage de loci polymorphes ( $P$ )	42
4.3.2.4 Le nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ) et le nombre effectif d'allèles ( $N_e$ )	43
4.3.2.5 L'indice de différenciation de Shannon	43
4.3.3 Diversité génétique inter-population	44
4.3.3.1 F-statistiques de Wright	44
4.3.3.2 Indices de diversité de Nei	45
4.3.3.3 Flux génique	46
4.3.3.4 Distance génétique entre sous - populations	46
4.4 Facteurs qui influencent la structure des populations	47
4.4.1 Système de reproduction	47
4.4.2 Taille et densité des populations	47

## CHAPITRE I : PROSPECTION ET COLLECTE

<b>INTRODUCTION</b>	49
<b>OBJECTIF</b>	50
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	51
1. Matériel	51
2. Méthodes	51
2.1 Prospection de la collecte	51
2.1.1 Stratégie de prospection	51

2.1.2 Détermination des sites de collecte .....	51
2.1.3 Échantillonnage .....	53
2.2. Caractéristiques évaluées lors de la collecte.....	53
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	55
<b>1. Zone de prospection</b> .....	55
1.1 Caractéristiques de la zone prospectée .....	55
<b>2. Prospection et collecte</b> .....	57
<b>3. Représentativité de la zone prospectée</b> .....	58
<b>4. Génotypes collectés</b> .....	59
4.1 Caractérisation des génotypes collectés.....	59
4.2 Variabilité de génotypes collectés .....	62
4.2.1 Descripteurs qualitatifs .....	62
4.2.2 Descripteurs quantitatifs .....	64
<b>5. Conclusions</b> .....	66

## CHAPITRE II : CARACTÉRISATION AGRO-MORPHOLOGIQUE DE LA COLLECTION

<b>INTRODUCTION</b> .....	67
<b>OBJECTIFS</b> .....	67
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	68
<b>1. Matériel végétal</b> .....	68
<b>2. Méthodes</b> .....	69
2.1 Conditions expérimentales .....	69
2.2 Design expérimental .....	69
2.3 Suivi de l'essai expérimental.....	72
2.3.1 L'installation de l'essai .....	72
2.3.2 L'entretien agronomique .....	72
2.3.3 La récolte et le battage .....	73
2.4 Caractérisation de la collection .....	74
2.5 Analyses statistiques.....	74
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> .....	79
<b>1. Caractérisation qualitative</b> .....	81
1.1 Descripteurs qualitatifs - morphologiques .....	81
1.1.1 Variabilité de descripteurs qualitatifs intra-accessions.....	81
1.1.2 Variabilité de descripteurs qualitatifs dans l'ensemble de la collection.....	96
1.2 Analyse factorielle des correspondances (AFC).....	102
1.2.1 Sur base d'un échantillon de 20 plantes et 14 descripteurs .....	103
1.2.2 Sur base d'un échantillon de 5 plantes ( <i>phytoPASS</i> ) et 14 descripteurs.....	104
1.2.3 Sur base d'un échantillon de 20 plantes et 6 descripteurs .....	107

1.2.4 Sur base d'un échantillon de 5 plantes ( <i>phytoPASS</i> ) et 6 descripteurs .....	107
<b>2. Caractérisation quantitative</b> .....	111
2.1 Descripteurs quantitatifs morphologiques .....	111
2.2.1 Variabilité phénotypique .....	111
2.2.2 Comparaison des moyennes .....	114
2.2 Descripteurs quantitatifs agronomiques .....	118
2.2.1 Variabilité phénotypique .....	118
2.2.2 Comparaison de moyennes .....	119
2.3 Corrélation agro-morphologique.....	123
2.4 Analyse de composantes principales (ACP).....	125
2.4.1 Sur base d'un échantillon de 20 plantes.....	125
2.4.2 Sur base d'un échantillon de 5 plantes ( <i>phytoPASS</i> ) .....	126
2.5 Regroupement par relations des ressemblances.....	130
<b>3 Conclusions</b> .....	131

### CHAPITRE III: CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE LA COLLECTION ET ANALYSE DE SA DIVERSITÉ ET STRUCTURE GÉNÉTIQUE

INTRODUCTION .....	137
OBJECTIFS .....	137
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	138
<b>1. Matériel et méthodes relatifs à la obtention des marqueurs de type microsatellites chez le <i>pigeonpea</i></b> .....	138
1.1 Matériel végétal .....	138
1.2 Méthodes.....	138
1.2.1 Stérilisation des grains du <i>pigeonpea</i> .....	138
1.2.2 Extraction d'ADN génomique pour la préparation des banques d'ADN.....	138
1.2.3 Quantification d'ADN.....	138
1.2.4 Isolement des loci microsatellites en <i>pigeonpea</i> .....	139
1.2.4.1 Génération d'une collection des fragments d'ADN génomique .....	140
1.2.4.1.1 Restriction de l'ADN génomique de <i>pigeonpea</i> .....	140
1.2.4.1.2 Traitement à la nucléase et à la phosphatase alcaline.....	140
1.2.4.1.3 Récupération des fragments d'ADN entre 400 et 900pb avec le Kit QiaExII.....	140
1.2.4.1.4 Hybridation des amorces SNX pour former l'adaptateur double brin.....	141
1.2.4.1.5 Ligation des fragments d'ADN avec des adaptateurs .....	141

1.2.4.1.6 Vérification de la ligation des adaptateurs par PCR.....	141
1.2.4.2. Enrichissement de la banque génomique en séquences microsatellites .....	142
1.2.4.2.1 Hybridation soustractive.....	142
1.2.4.2.2 Elutions des séquences contenant les microsatellites .....	142
1.2.4.2.3 Insertion des fragments d'ADN gen enrichis en microsatellites dans le Vecteur pCR®II et transformation dans TOP10F' .....	143
1.2.4.2.4 Criblage des clones positifs par sonde froide .....	143
1.2.4.3. Séquençage des clones retenus.....	146
1.2.4.3.1 Isolement d'ADN plasmidique en grande série.....	146
1.2.4.3.2 Séquençage des clones .....	147
1.2.4.4 Définition des amorces .....	148
1.2.4.5 Optimisation des conditions d'amplification pour chaque paire d'amorce.....	149
1.2.4.6 Vérification du polymorphisme des microsatellites retenus.....	150
1.2.4.7 Détermination de la taille des allèles microsatellites .....	150
<b>2 Matériel et méthodes relatifs à la caractérisation moléculaire d'une collection de <i>pigeonpea</i>.....</b>	<b>151</b>
2.1 Matériel végétal .....	151
2.2 Amorces utilisées .....	155
2.3 Méthodes .....	155
2.2.1 Prélèvement de l'ADN - <i>phytoPASS</i> .....	155
2.2.2 Extraction d'ADN .....	157
2.2.3 Caractérisation de la collection de <i>pigeonpea</i> sur base de microsatellites.....	157
2.2.3.1 Amplification PCR.....	157
2.2.3.2 Analyse des fragments sur séquenceur capillaire.....	157
<b>3. Matériel et méthodes relatifs à l'analyse de la diversité et de la structure génétique d'une collection de <i>pigeonpea</i> .....</b>	<b>158</b>
3.1 Loci étudiés .....	158
3.2 Base de données .....	158
3.3 Analyses statistiques et logiciels utilisées.....	158



<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>160</b>
<b>1 Obtention des marqueurs de type microsatellites chez le</b>	
<b><i>pigeonpea</i> .....</b>	<b>160</b>
1.1 Isolement des loci microsatellites en <i>pigeonpea</i> .....	160
1.2 Définition des amorces.....	165
1.3 Optimisation des conditions d'amplification.....	168
1.4 Détermination de la taille des allèles microsatellites. ....	169
1.5 Efficience de l'isolement de marqueurs microsatellites en	
<i>pigeonpea</i> .....	170
1.6 Vérification du polymorphisme des microsatellites .....	171
1.7 Caractéristiques des marqueurs microsatellites du <i>pigeonpea</i> ..	172
1.8 Discussion .....	173
1.9 Conclusions .....	174
<b>2 Caractérisation moléculaire d'une collection de <i>pigeonpea</i> sur base</b>	
<b>des microsatellites.....</b>	<b>175</b>
2.1 Extraction d'ADN-PhytoPASS.....	175
2.2 Amplification PCR.....	175
2.3 Analyse des fragments .....	177
2.4 Conclusions.....	177
<b>3 Analyse de la diversité et de la structure génétique d'une</b>	
<b>collection de <i>pigeonpea</i>.....</b>	<b>178</b>
3.1 Analyse de la diversité des marqueurs .....	178
3.2 Diversité génétique intra-population.....	180
3.2.1 Le pourcentage de loci polymorphes ( $P$ ) .....	180
3.2.2 Le nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ) et le nombre effectif	
d'allèles ( $N_e$ ) .....	181
3.2.3 L'indice de diversité de Shannon ( $I$ ).....	181
3.2.3 L'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et l'hétérozygotie	
attendue ( $H_e$ ).....	182
3.2.4 Les fréquences alléliques par locus .....	183
3.3 Diversité génétique inter-population.....	186
3.3.1 F-statistiques de Wright .....	186
3.3.2 Indice de diversité de Nei .....	188
3.3.3 Flux de gènes.....	189
3.3.4 Etude des ressemblances entre accessions.....	190
3.3.4.1 Analyse factorielle AFC (Analyse factorielle de	
correspondances.....	190
3.3.4.2 Distance génétique entre les groupes	
d'accessions .....	193
3.4 Analyse de la structure génétique des populations .....	198
3.5 Conclusions.....	199

## **CHAPITRE IV : SYNTHÈSE DES RESULTATS ET CONCLUSION**

### **GÉNÉRALE**

<b>SYNTHÈSE DES RÉSULTATS .....</b>	<b>201</b>
<b>1. Synthèse de la caractérisation agro-morphologique .....</b>	<b>201</b>
<b>2. Synthèse de la caractérisation moléculaire .....</b>	<b>202</b>
<b>3. Corrélation de la caractérisation agro-morphologique et moléculaire.....</b>	<b>204</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>207</b>
<b>1. Conclusion générale .....</b>	<b>207</b>
<b>2. Perspectives.....</b>	<b>208</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>209</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>221</b>



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analyse moléculaire de la variance
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide Ribonucléique
CMS	Stérilité Male Cytoplasmique
EST	Expressed Sequence Tags
Fw	Forward
FUNDP	Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix Namur
IBPGR	International Board for Plant Genetic Resources
ICRISAT	International Centre of Agronomy Research in Dry Area
IPGRI	International Plant Genetic Resources Institute
MAS	Sélection assistée par marqueur
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rv	Reverse
SMD	Maladie de la mosaïque de la stérilité
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean



## INTRODUCTION

Durant les dernières années, l'activité agro-industrielle a favorisé de manière inquiétante la disparition de génotypes adaptés aux conditions locales. Tel est le cas du *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L) Millsp) au Pérou. Cette culture est une des légumineuses les plus cultivées au monde. Elle est adaptée aux environnements tropicaux et sub-tropicaux entre 30°N et 30°S de latitude, dans une gamme de températures comprises entre 20° et 40°C (Sinha, 1977).

Nutritionnellement parlant, le *pigeonpea* est un produit riche en protéines (17.9 à 24.3 g/100 g), en hydrates de carbone (57.3 à 58.7%), et qui contient 1.2 à 8.1% de fibres brutes, 0.6 à 3.8% de lipides (Salunkhe *et al.*, 1986), et des minéraux tels que le calcium, le phosphore, le magnésium, le fer, le soufre, et le potassium. C'est aussi une bonne source de vitamines solubles, surtout de thiamine, riboflavine, acide nicotinique, et choline.

En Amérique du Sud, on cultive le *pigeonpea* comme culture pérenne ou comme culture annuelle soit en monoculture ou associé au maïs. Sa culture est à la base orientée vers la consommation locale et depuis quelques années comme culture d'exportation. Adapté à diverses conditions climatiques, ce pois représente la source principale de revenus et de protéines pour de nombreux habitants, spécialement pour les plus pauvres.

Ainsi, pour les petits agriculteurs, la culture du *pigeonpea* constitue un moyen essentiel de subsistance, que ce soit pour la consommation alimentaire propre ou pour une commercialisation au niveau local. Par ailleurs, les variétés cultivées de *pigeonpea* s'avèrent, depuis ces dernières années, être un produit d'exportation intéressant. De plus, l'importance d'une légumineuse tolérante à la sécheresse telle que le *pigeonpea* - laquelle combine plusieurs caractéristiques importantes - ne peut pas être ignorée.

Toutefois, le manque de recherche dans les domaines des nouvelles techniques de caractérisation variétale, de conservation et d'utilisation du germoplasme constitue un obstacle majeur qui empêche l'augmentation de la surface cultivée et de la productivité du *pigeonpea*.

---

## 1. Justification

L'augmentation de la demande de la graine de *pigeonpea* pour l'agro-industrie d'exportation a pour conséquence une augmentation de la surface cultivée, et donc une augmentation de la demande de semence. Comme la graine à l'état vert est requise pour l'agro-industrie, la possibilité des agriculteurs de produire leur propre semence est très limitée, eux préfèrent la vendre en vert. Dans les dernières années L'IPEL (Institut péruvien de légumineuses) a développé la variété ISO10 et récemment la variété Prompex2000, ces deux variétés ont grandement été adaptées par les agriculteurs et peuvent déplacer les *landraces* locales dans le futur. Le risque de perdre les *landraces* adaptées aux conditions de salinité et de sécheresse de la région nord du Pérou est de plus en plus évident. C'est pour cette raison que dans ce travail, nous nous intéresserons à la collecte de ces *landraces*, à leur évaluation phénotypique à l'aide de descripteurs et à leur caractérisation moléculaire à l'aide de marqueurs microsatellites (Figure1).

### 1.1 Description de la problématique socio - économique

Dans notre zone d'étude (*Lambayeque* au nord du Pérou) l'indice de pauvreté est généralement supérieur à 30%, dans certaines zones il atteint 70%. D'un autre côté, le taux de malnutrition va de 25% à 58% chez les enfants de moins de 5 ans. La promotion d'une plante comme le *pigeonpea*, à forte teneur nutritive, permettrait d'assurer l'alimentation d'une population en manque.

Plus de 8000 familles de petits agriculteurs cultivent des légumineuses dans des secteurs de moins d'un hectare. D'autre part, la demande de main d'œuvre est élevée chez le *pigeonpea*, si on fait une estimation de la génération d'emploi produit, plus de 800.000 postes de travail sont requis, du semis jusqu'à la post-récolte de grain sec.

Actuellement dans le département de *Lambayeque*, il existe 6 entreprises de classification de grain sec et trois de traitement agro-industriel pour l'exportation du grain en vert (en boîtes ou congelées). Plus de 15 entreprises exportatrices promeuvent l'ensemencement par contrat,

Dans ce contexte socio-économique péruvien, le *pigeonpea* joue un rôle essentiel sur les plans nutritionnel et économique. En effet, ce pois tient une place importante dans l'alimentation de millions de personnes vu son haut contenu protéique et vu que sa culture constitue une des principales sources de revenus pour les petits agriculteurs.

Son intérêt agroalimentaire évident pour l'exportation s'accompagne fort heureusement d'un impact positif de sa culture sur la conservation des sols : ce pois, comme toutes les légumineuses, a un effet favorable sur les caractéristiques physiques et chimiques du sol.

## 1.2 Description de la problématique d'amélioration génétique

La diversité des pratiques agronomiques en *pigeonpea* a déjà été évaluée au niveau local. Ainsi, la diversité des systèmes traditionnels de production a été étudiée pour ce qui concerne les aspects de productivité, de précocité, de résistance aux contraintes du sol, et de résistance aux ravageurs.

Toutefois, il n'existe pas au niveau péruvien, une collection centralisée de génotypes qui permettrait de conserver et d'utiliser le matériel génétique adapté aux différentes conditions agronomiques du Pérou.

En l'absence d'une telle collection convenablement caractérisée phénotypiquement et génotypiquement, il est difficilement concevable de développer un programme de sélection végétale du *pigeonpea* qui puisse répondre aux besoins d'un pays soumis à des conditions climatiques aussi diverses que celles de la côte Pacifique et des Andes, voire de l'Amazonie.

Il n'y a pas de recherche régionale sur le sujet; celle-ci existe en Inde où le *pigeonpea* est fort utilisé, mais dans des conditions agronomiques et socio-économiques très différentes, et plutôt pour une récolte de grain sec alors qu'au Pérou, il s'agit d'une récolte de grain vert.

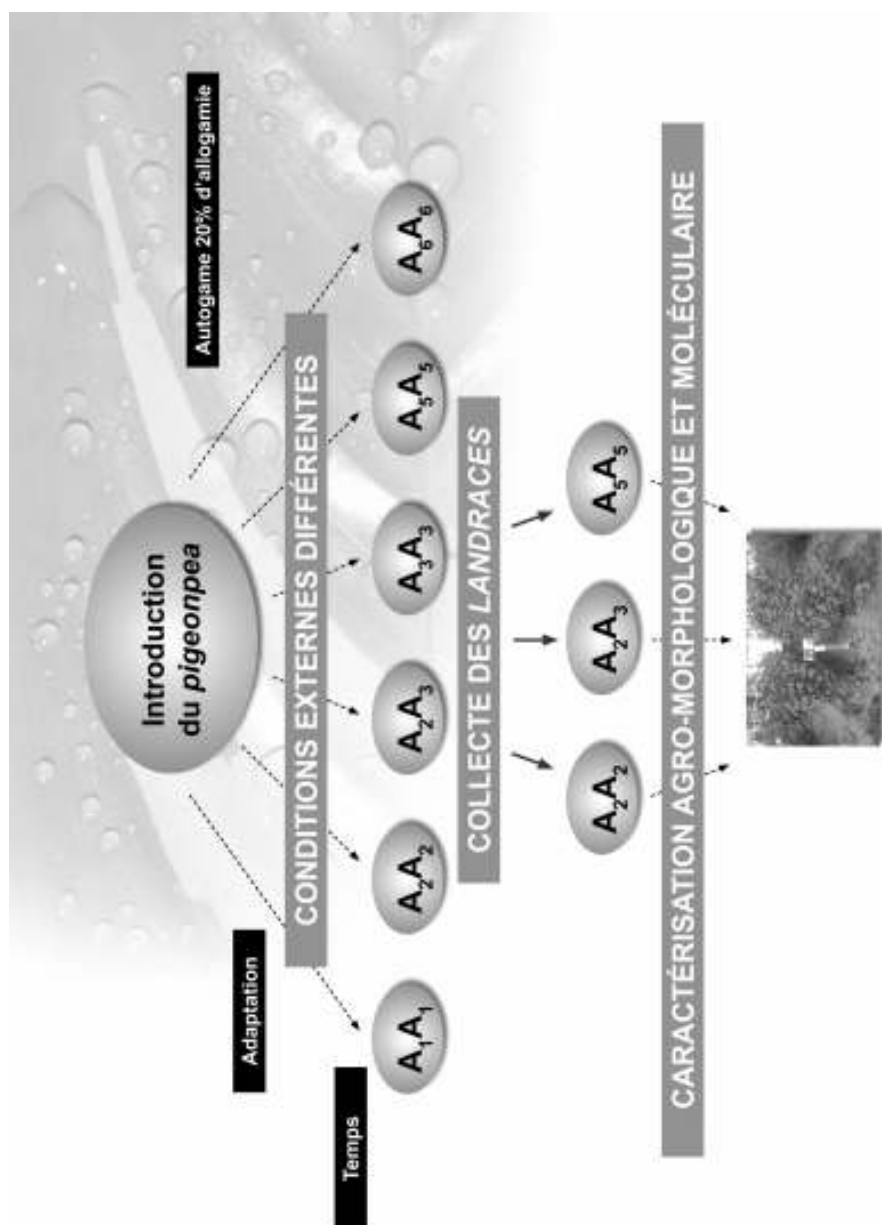
Au-delà des actions de conservation, l'établissement à Lima d'une large collection de cultivars de *pigeonpea* et l'application des techniques modernes d'identification et de caractérisation variétale ouvriraient la voie à la sélection assistée par marqueurs moléculaires

En effet, si la variabilité génétique est la matière première du sélectionneur, on ne peut la conserver efficacement qu'après une connaissance précise de celle-ci. Non seulement cette connaissance permet une bonne conservation ; mais en plus, elle fait état de la diversité disponible pour l'amélioration et précise la structure génétique des formes préservées in situ. Il est utile d'étudier les mécanismes de la conservation de la variabilité génétique au sein des populations naturelles ou cultivées (Hedrick, 1998) et de connaître leur structure génétique.

Cette étude permettra une meilleure connaissance de la variabilité et de la structure génétique des populations de *pigeonpea*. Ceci sera utile pour la stimulation de facteurs favorisant le maintien de la diversité génétique.

A long terme, cette étude devrait contribuer à l'établissement d'une collection caractérisée agro-morphologiquement et génétiquement. C'est le point de départ de tout programme d'amélioration et de production de nouvelles variétés de *pigeonpea* dont la surface cultivée pourrait s'étendre à des régions plus sèches, dans des sols présentant des problèmes de salinité, caractéristique de la cote péruvienne.





**Figure 1** : Stratégie de la recherche.

## 2. Les objectifs de la recherche

La recherche s'est établie parallèlement au Pérou et en Belgique. La prospection et la collecte ont été réalisées au Pérou tout comme la caractérisation agro-morphologique de la collection. Par contre, l'obtention de marqueurs microsatellites, le génotypage de la collection ainsi que l'analyse de la diversité a été faite dans URBV – Namur en Belgique.

La prospection et la collecte des *landraces* dans la région nord du Pérou ont été réalisées dans le but d'étudier la variabilité agro-morphologique et génotypique du *pigeonpea*. L'objectif a été de d'établir, une collection caractérisée phénotypiquement et génotypiquement de *pigeonpea* au Pérou, ce qui est le point de départ de tout programme d'amélioration.

D'ailleurs, pour l'agro-industrie, l'étude des traits agronomiques intéressants, comme la précocité et les caractéristiques de la gousse d'exportation seront analysées dans la caractérisation agro-morphologique.

L'utilisation de marqueurs moléculaires a permis l'identification irréfutable des individus ainsi conservés en collection, la détermination des distances génétiques qui les séparent et la structure de la diversité.

De plus, cette étude permet de concrétiser les efforts isolés de diverses institutions péruviennes en vue de conserver et d'utiliser les nombreux cultivars locaux (*landraces*) de *pigeonpea* dans des programmes d'amélioration.

## 3. Plan de la thèse

Le **premier chapitre**, intitulé : "Prospection et collecte" décrit la façon dont les *landraces* péruviennes ont été collectées de façon à représenter le maximum de variabilité chez le *pigeonpea* à *Lambayeque* au Nord du Pérou.

Le **deuxième chapitre**, intitulé : "Caractérisation agro-morphologique de la collection" présente la caractérisation des populations, issues de ces *landraces*, basée sur des descripteurs morpho-agronomiques.

Le **troisième chapitre**, intitulé "Caractérisation moléculaire de la collection" présente tout d'abord l'obtention des marqueurs moléculaires de type microsatellite, ensuite la caractérisation moléculaire de ces mêmes populations à l'aide des marqueurs microsatellites. Et finalement l'analyse de la diversité et de la structure de ces populations.

Enfin le **quatrième chapitre**, présente une synthèse des résultats et une conclusion générale.



## 1. Généralités de *pigeonpea*

Dans cette partie nous ferons une révision bibliographique de l'espèce étudiée, le *pigeonpea*. Différents aspects seront décrits comme sa classification taxonomique, son origine ainsi que la diversité de ses pools génétiques. Nous parlerons aussi de sa morphologie, écologie, distribution, utilisation, culture et aussi des objectifs d'amélioration. Finalement, nous passerons en revue les statistiques de production et de surface cultivée de cette espèce.

### 1.1 Taxonomie, Origine et Pools génétiques

#### 1.1.1 Taxonomie

Le *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) appartient à la sous-tribu *Cajaninae* de la tribu *Phaseoleae*, la sous-famille *Papilionoideae* de la famille des légumineuses.

Famille : Légumineuses ou Papilionacées

Sous-famille: *Papilionoideae*

Tribu : *Phaseoleae*

Sous-tribu: *Cajaninae*

Genre: *Cajanus*

On retrouve parmi les membres de la tribu *Phaseoleae* (la plus importante sur le plan agricole) des espèces comestibles (*Phaseolus*, *Vigna*, *Cajanus*, *Lablab* etc.), dont le *Cajanus cajan* est la seule espèce domestiquée de la sous-tribu *Cajaninae*.

La sous-tribu *Cajaninae* se distingue par la présence de glandes vésiculaires sur les feuilles, le calice et les gousses. Onze genres apparentés comprenant *Rhynchosia*, *Eriosema*, *Dunbaria*, *Flemingia*, et *Paracalyx* ont été classés dans la sous-tribu *Cajaninae* (Van der Maesen, 1990).

Indépendamment du *pigeonpea*, seule une espèce sauvage, *Cajanus scarabaeoides* est commune et répandue dans l'ensemble de l'Asie du sud et du Sud-Est, des îles Pacifiques, et du nord de l'Australie. On trouve la plus grande diversité des espèces sauvages de *Cajanus* au Myanmar, en Yunnan-Chine, et en Australie du nord. Plusieurs espèces telles que *C. villosus*, *C. elongatus*, *C. granadiflorus*, et *C. niveus* qui étaient collectées au nord-est de l'Inde sont devenues rares ou éteintes à l'heure actuelle.

Le genre *Cajanus* comporte 32 espèces, dont 18 sont endémiques d'Asie, 13 d'Australie, et 1 d'Afrique occidentale (Van der Maesen, 1990). Toutes les espèces du genre sont diploïdes avec  $2n = 22$  chromosomes.

Les 32 espèces ont été regroupées en six sections basées sur l'habitude de croissance, la forme de la feuille, la pilosité, la nature de la corolle, la dimension de la gousse, et la présence de strophiole sur la graine (prolifération glandulaire de la graine qui empêche le passage d'eau requis pour la germination).

Les 18 espèces non rampantes sont réparties en 3 sections: *Cajanus* (2), *Atylosia* (7), et *Fruticosa* (9). Les espèces cultivées avec leur ancêtre (*C. cajanifolius*) ont été reprises dans la section *Cajanus*. Les 11 espèces rampantes sont incluses dans deux sections, *Cantharospermum* (5) et *Volubilis* (6) et les 3 espèces restantes dans la section *Rhynchosoides*. Trois espèces de *cajanus* ont été subdivisées en variétés botaniques; *C. scarabaeoides* var. *pedunculatus* et var. *scarabaeoides*, *C. reticulatus* var. *grandifolius*, var. *reticulatus* et var. *maritimus* et *C. volubilis* var. *burmanicus* et var. *volubilis*.

#### 1.1.1.1 Cytotaxonomie et hybridation

Les premiers taxonomistes avaient classé de manière peu satisfaisante l'*Atylosia* et le *Cajanus* sous deux genres différents. C'est grâce aux études d'hybridation interspécifique et de cytotaxonomie que leur rapprochement est devenu irréfutable. Ses études ont montré le besoin important de fusionner les deux genres selon les règles internationales de la nomenclature botanique. Finalement, Van der Maesen travaillant à l'ICRISAT a mis à jour la taxonomie du *Cajanus* et a fusionné les deux genres sous le nom de *Cajanus* après l'analyse systématique des données morphologiques, cytologiques, et chimio-taxonomiques qui apparentent ces deux genres (ICRISAT, 2008).

La plupart des espèces sauvages y compris *C. cajanifolius*, *C. lineatus*, *C. sericeus*, *C. scarabaeoides*, *C. albicans*, et *C. trinervius* d'origine indienne ; *C. reticulatus* (var. *grandifolius*), *C. confertiflorus*, et *C. latisepalus* d'origine australienne produisent des hybrides fertiles avec le *pigeonpea*. Concernant l'analyse du caryotype du *pigeonpea*, plusieurs espèces sauvages et leurs hybrides interspécifiques ont montré une haute homologie et un appariement presque complet. Parmi les espèces sauvages compatibles testées, celles d'origine indienne ont montré une homologie plus proche que celles d'origine australienne.

#### 1.1.1.2 Taxonomie moléculaire

Des marqueurs moléculaires, tel que la RFLP (restriction fragment length polymorphism) d'ADN nucléaire et mitochondrial, et l'RAPD (randomly amplified polymorphic) ont été utilisées avec succès pour détecter la diversité génétique et déterminer des rapports phylogénétiques dans le genre *Cajanus* et autres genres apparentés (*Dunbaria*, *Eriosema*, et *Rhynchosia*). Suffisamment de polymorphisme a été détecté parmi les espèces. Les topologies d'arbres de parcimonie et des analyses des matrices de ressemblance étaient semblables, mais pas identiques. Les modèles de clustering ont confirmé les résultats largement publiés sur la

phylogénie basée sur la morphologie, la cytologie, l'hybridation, et les analyses de protéines et d'isozymes.

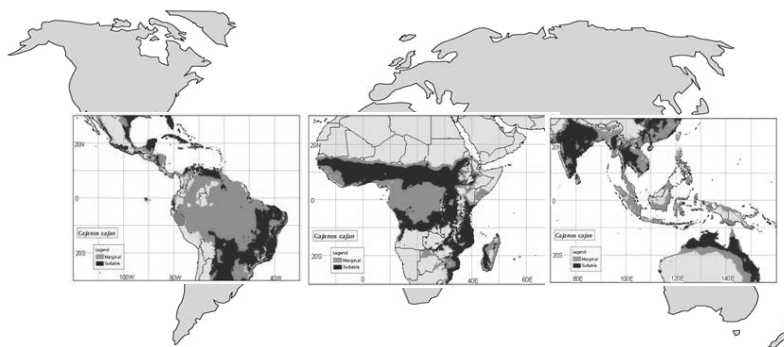
### 1.1.2 Origine et pools génétiques

#### 1.1.2.1 Origine

Le *pigeonpea* est originaire de l'Inde. Il a été connu dans l'ancienne Egypte il y a 4000 ans. Selon les différentes sources consultées, la distribution naturelle du *pigeonpea* se limite aux pays proches de l'Océan Indien, de l'Afrique Orientale jusqu'à l'Egypte, l'Inde, et le Sud-est asiatique. Van der Maesen, (1990) considère l'Inde comme le centre d'origine du *pigeonpea* et l'Afrique de l'Est, où la récolte a été développée pendant au moins 4000 ans, comme un centre secondaire de diversité.

On estime que sa domestication s'est faite au début de l'agriculture en Inde, vers l'an 2200 avant JC, dans le bassin de l'Indus (actuellement Pakistan). A partir de ce bassin, il se serait étendu rapidement comme culture dans le vieux monde tropical en Afrique de l'Est (Milind *et al.*, 2007) ce qui explique l'origine très discutée du *pigeonpea*. (Verschueren, 1992). Puis au moyen du commerce d'esclaves, il se serait étendu au continent américain.

Aujourd'hui le *pigeonpea* est largement cultivé dans toutes les régions tropicales et semi-tropicales du vieux et du nouveau monde. On le retrouve principalement en Asie et en Afrique ainsi que dans quelques régions d'Australie et d'Amérique latine (Jha et Ohri, 1996) (Figure1).



**Figure 1 :** Distribution géographique de la culture du *pigeonpea*.

### 1.1.2.2 Pools génétiques

Sur base de la difficulté de transfert naturel des gènes, on distingue un pool génique primaire, secondaire et tertiaire (Quadrogo, 2003). Le Tableau 1 montre les parents sauvages du *pigeonpea* et leur classification dans les pools génétiques.

**Tableau 1.** Pools génétiques du *pigeonpea*.

Gène Pool Primaire	Gène Pool Secondaire	Gène Pool Tertiaire
Collection des cultivars du <i>pigeonpea</i>	<i>C. acutifolius</i> (F.v.Muell) van der Maesen <i>C. albicans</i> (W. & A.) van der Maesen <i>C. cajanifolius</i> (Haines) van der Maesen <i>C. lanceolatus</i> (W.V. Fitzg) van der Maesen <i>C. latisepalus</i> (Reynolds & Pedley) van der Maesen	<i>C. geonsis</i> Dalz. <i>C. heynei</i> (W. & A.) van der Maesen <i>C. mollis</i> (Benth.) van der Maesen <i>C. platycarpus</i> (Benth) van der Maesen <i>C. rugosus</i> (W. & A.) van der Maesen
	<i>C. lineatus</i> (W.&A.) van der Maesen <i>C. reticulatus</i> (Drylander) F. v. Muell var. <i>grandifolius</i> (F. v. Muell) van der Maesen var. <i>reticulatus</i>	<i>C. volubilis</i> (Blanco) Blanco <i>C. kerstingii</i> Harms
	<i>C. scarabaeoides</i> (L.) Thouars var. <i>pendunculatus</i> (Reynolds & Pedley) van der Maesen var. <i>scarabaeoides</i>	<i>Rhyncosia</i> spp.
	<i>C. sericeus</i> (Benth. Ex Bak.) van der Maesen <i>C. trinervius</i> (DC) van der Maesen	<i>Dunbaria</i> spp. <i>Erisema</i> spp. <i>Flemingia</i> spp.

Source: Van der Maesen (1990)

Le pool génétique primaire d'une espèce donnée peut être subdivisé en 5 catégories principales qui forment un continuum écologique et évolutif reliant les formes sauvages aux formes domestiques (Zeven, 1998). Ce sont : les formes sauvages ou adventices, les cultivars obsolètes ou anciens, les lignées en sélection avancée, les variétés nouvelles et les variétés commerciales (Hoyt, 1992).

Le pool génétique secondaire est constitué d'espèces végétales qui ne peuvent être utilisées qu'en croisement aux prix d'un effort accru. Les plantes de ce groupe peuvent être croisées avec celles du pool primaire. Le pool secondaire se caractérise par le transfert des gènes possible mais parfois difficile. Le pool tertiaire constitue l'extrême limite des ressources génétiques utilisables (par les voies habituelles de sélection et d'amélioration des plantes). Le matériel végétal de ce dernier groupe peut

être croisé avec ceux du pool primaire mais les hybrides sont stériles. Par ailleurs, le transfert de gènes n'est possible que par des mesures radicales comme la fusion de protoplastes. Les espèces sauvages ou cultivées peuvent appartenir à ces trois catégories en fonction des difficultés de transfert de gènes (Hoyt, 1992).

Six des espèces sauvages indiennes : *C. albicans*, *C. cajanifolius*, *C. scarabaeoides*, *C. trinervius*, *C. lineatus*, *C. sericeus* et le *pigeonpea* ont été croisées avec succès. Des hybrides interspécifiques ont également été obtenus avec des espèces australiennes : *C. reticulatus*, *C. acutifolius*, *C. confertiflorus*, *C. lanceolatus* et *C. latisepalus*. Cependant, les hybrides ont montré plus d'anomalies méiotiques que les hybrides entre le *pigeonpea* et les espèces indiennes (Dundas, 1990). *C. platicarpus* a été croisé avec succès avec le *pigeonpea* en utilisant la culture d'embryon (Mallikarjuna et Moss, 1995).

La banque de gènes de l'ICRISAT contient actuellement 213 accessions représentant 20 espèces, sans compter environ 13.300 accessions des *pigeonpea* cultivés. Le patrimoine génétique sauvage assemblé à l'ICRISAT inclut également d'autres genres apparentés : *Rhynchosia* (35 espèces, 303 accessions), *Flemingia* (8 espèces, 18 accessions), *Eriosema* (4 espèces, 7 accessions), et *Dunbaria* (2 espèces, 12 accessions). Sur la base du succès de l'hybridation on peut distinguer le pool secondaire et tertiaire du *pigeonpea*. Les espèces du pool héréditaire secondaire sont infertiles avec le *pigeonpea*. Les espèces qui ne se croisent pas aisément avec le *pigeonpea* sont placées dans le pool héréditaire tertiaire. (Milind *et al.*, 2007).

Onze genres relatifs comprenant *Rhynchosia*, *Dunbaria*, et *Flemingia* ont été décrits et peuvent être pris en compte pour constituer le pool héréditaire tertiaire, alors que les autres espèces du genre *Cajanus* constituent le pool héréditaire secondaire du cultivar (Van der Maesen, 1990; Jha et Ohri, 1996).

#### 1.1.2.2.1 Types de cultivars

Plusieurs sortes de formes évolutives peuvent être reconnues dans le *pigeonpea* sur base du type de plante, de la durée de la récolte, de la sensibilité à la photopériode, du nombre de fleurs et de la dimension de l'inflorescence, de la dimension de la gousse et du grain, de la couleur de la graine, du goût, de la déhiscence de la gousse, de la dormance de la graine, de la vigueur de la plante, des préférences d'habitat, et de la constitution biochimique. Ces types de cultivars ont des exigences agronomiques et agro-écologiques différentes : époque de plantation, types et niveaux de technologie, préférences du consommateur et usage de la récolte (ICRISAT, 2008).



## 1.2 Morphologie du *pigeonpea*

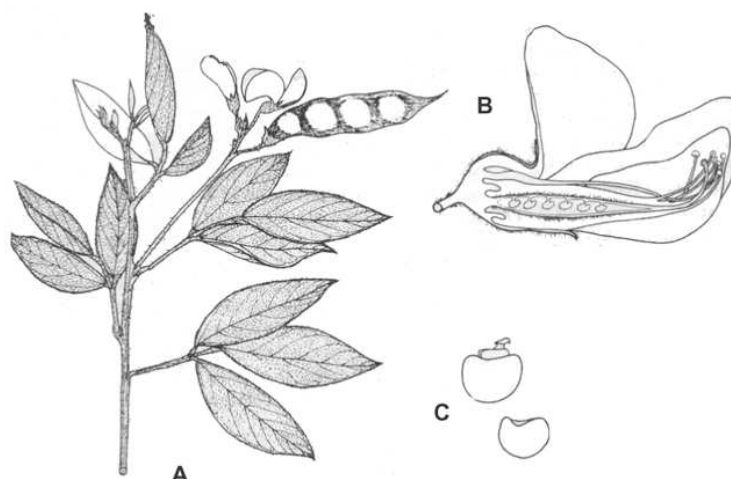
Le *pigeonpea* est un arbuste dont la durée de vie varie entre 1 et 5 ans. Mais habituellement, il se comporte comme une plante annuelle et peut atteindre 0,5 à 4m de hauteur. Ses racines sont minces, peu nombreuses et peuvent aller jusqu'à 2 m de profondeur. Sa tige peut atteindre 15 cm de diamètre et porte de nombreuses petites branches (Mado, 2008).

Ses feuilles sont trifoliées pubescentes, sa forme varie de lancéolé à oblongue (figure 2). Sa tige fortement lignifiée peut être droite jusqu'à inclinée. Le diamètre de la tige varie de 1 à 0,8 cm. Les branches primaires peuvent se ramifier en branches secondaires, qui si elles portent des inflorescences constituent des branches reproductives. Les inflorescences sont de racèmes pédonculés de 1.5 cm de long. La gousse mesure de 4 à 7 cm de long, 1 cm de large, elle contient de 2 à 7 graines.

Les fleurs sont zigomorphes (irrégulières) avec un calice de sépales soudés ; la corolle comporte 5 pétales libres dont le supérieur externe forme l'étendard. Les deux latéraux plus ou moins parallèles forment les ailes, les deux inférieurs plus ou moins soudés et internes forment la carène.

Les étamines sont généralement au nombre de 10, diadelphes, 9 étamines sont unies par les filets tandis que la 10ème étamine (la supérieure) est libre. L'anthère est à 2 loges à déhiscence longitudinale. L'ovaire supère, est uni carpellaire. Les fruits, habituellement secs, sont des gousses de déhiscence intermédiaire. Les graines renferment un embryon courbe, à cotylédons épais, et sont pratiquement dépourvues d'albumen.

Le système de racines approfondies permet l'absorption d'eau en périodes de sécheresse, de même, il développe des nodules de *Rhizobium* qui assurent la fixation d'azote.



**Figure 2 :** Morphologie de *pigeonpea* : Tige avec feuilles trifoliées, fleurs et fruits (A), coupe longitudinale d'une fleur (B), graine (C).

### 1.3 Ecologie et distribution du *pigeonpea*

Le *pigeonpea* est la cinquième légumineuse à grain tropicale la plus importante des tropiques semi-arides (Milind *et al.*, 2007). Il est maintenant cultivé dans 50 pays d'Asie, d'Afrique et des Caraïbes. Il est cultivé dans plus de 25 pays tropicaux et subtropicaux, comme récolte unique ou associée. La production la plus élevée du *pigeonpea* est enregistrée en Inde, où il est la légumineuse à grain la plus largement cultivée, en seconde position derrière le *pois chiche*. (Milind *et al.*, 2007). Il a la capacité inhérente de supporter les contraintes de l'environnement (surtout la sécheresse) ce qui en fait une culture d'introduction.

Du fait que cette espèce n'a pas été retrouvée en milieu sauvage, son habitat naturel reste incertain. Le *pigeonpea* préfère les habitats herbeux des zones tropicales avec des pluviométries optimales comprises entre 600 et 1000 mm de pluie par an. Toutefois, il se développe bien dans les zones humides avec des pluviométries de 2500 mm de pluie par an et dans les zones semi-arides avec des pluviométries de 400 mm de pluie par an (Mado, 2008).

Le *pigeonpea* est une espèce de jours courts et la plupart des cultivars fleurissent en longueurs de jour de 11 à 11.5 h. La photopériode critique requise pour déclencher la floraison est spécifique à l'espèce et même au cultivar spécifique. Le degré de sensibilité varie quantitativement (Saxena et Sharma, 1990). La collection mondiale de *pigeonpea* originaire de 74 pays (13.077 accessions) réuni à l'ICRISAT provenant d'une large diversité d'environnements présente des accessions d'une forte sensibilité à la photopériode et d'autres, peu sensibles. La récolte montre également une grande variation dans les types de maturité (de 90 à 300 jours). Les cultivars ou races traditionnels sont de durée moyenne à longue. Ils sont récoltés de 6 à 12 mois après le semis. D'ailleurs, ils sont généralement développés en tant que récolte pérenne de haies. Leur sensibilité à la photopériode leur permet d'être développés comme récolte d'hiver dans les environnements d'hiver doux.

Le *pigeonpea* de courte durée permet la production de multiples récoltes dans les climats tropicaux. Il prend de 100 à 140 jours pour mûrir et produire la première récolte. Plus récemment, des génotypes extra précoces qui mûrissent en 90 jours ont été développés. Les génotypes de courte durée ont généralement moins de sensibilité à la photopériode que les types de longue durée.

Le *pigeonpea* se développe principalement en utilisant l'humidité résiduelle du sol après la récolte de la culture associée. Il se développe généralement là où les températures se situent de 18 à 30,8°C, mais dans les sols humides, il peut résister à des températures de 35,8°C ou supérieures.

Son système profond de racines permet l'utilisation optimale de l'humidité et des éléments nutritifs. Il améliore aussi la structure du sol (Nene et Sheila, 1990). Il présente une croissance rapide, forte, boisée avec des racines latérales bien développées dans les couches superficielles du sol.

Le *pigeonpea* peut se développer dans une diversité de textures de sol, des sols sableux aux argileux lourds. Il se développe mieux dans un sol à pH de 5.0 à 7.0. Il se développe bien dans des sols à basse fertilité, ce qui en fait un favori en agriculture de subsistance.

Le *pigeonpea* est également connu pour sa capacité à fixer l'azote comme la plupart des légumineuses. Il peut également accéder aux phosphates insolubles dans les sols pauvres en phosphore, augmentant la disponibilité en phosphore soluble pour les récoltes suivantes dans la rotation (Fujita *et al.*, 2004). Son exigence en P pour la production de la matière sèche est faible comparé au soja (*Glycine maximum* (L.) (Adu-Gyamfi *et al.*, 1990).

#### 1.4 Utilisations du *pigeonpea*

En général, le *pigeonpea* peut être considéré comme une espèce sous exploitée et sous valorisée, malgré qu'elle joue un rôle important dans la sécurité alimentaire et l'amélioration de la pauvreté vu ses multiples usages. D'ailleurs, sa valeur est très appréciée car c'est une culture d'usage polyvalent. Il est cultivé entre autres pour l'alimentation, le fourrage, le bois de chauffage, et les haies. Il peut aussi être utilisé comme culture coupe-vent, engrais vert, pour la confection de toits de maisons (Rao *et al.*, 2002). Cette plante connaît de nombreuses utilisations. Ainsi, elle est utilisée comme:

- **Nourriture pour l'homme** : Les graines du *pigeonpea* sont consommées. Le *pigeonpea* est une récolte vivrière (pois secs, farine, ou pois verts). La graine du *pigeonpea* contient de 20 à 30% de protéines, elle est riche en acides aminés essentiels (méthionine, lysine, et tryptophane), hydrates de carbone, minéraux, et contient beaucoup de vitamines A et C (Saxena *et al.*, 2002).

Les pois secs peuvent être germés brièvement, ensuite cuits, pour une saveur différente des pois verts. La germination augmente également la digestibilité du pois sec grâce à la réduction de sucres non digestibles qui sinon, resteraient dans les pois secs cuits. Sa richesse en protéines en fait un supplément idéal aux céréales traditionnelles, bananes ou alimentation basée sur des tubercules qui contiennent généralement très peu de protéines.

Dans quelques endroits, tels que la République Dominicaine, Hawaï, l'Equateur et le Pérou, le *pigeonpea* est cultivé pour la mise en boîte de ses graines.

- **Plante médicinale** : Le *pigeonpea* a de nombreuses utilisations en médecine naturelle. Les jeunes feuilles sont appliquées sur les endroits douloureux, on s'en sert aussi contre les démangeaisons. Elles sont également utilisées sous forme de décoction pour le traitement de la diarrhée. Les graines sèches du *pigeonpea* écrasées et prises avec un peu de vin permettent de soigner le début d'anthrax (furuncles). La poudre des graines sèches mélangée avec de la banane non mûre est utilisée comme cataplasme pour soigner les infections extérieures.

- **Aliment pour les animaux** : Le *pigeonpea* est aussi une source de fourrage. Un mélange à quantité égale de graines sèches du *pigeonpea* et de maïs écrasés constitue un bon aliment pour la volaille. Les feuilles et les gousses de *pigeonpea* sont également utilisées dans l'alimentation des ruminants et en particulier des bovins.

- **Couverture du sol**. Il est dans quelques régions une récolte importante pour l'engrais vert. Celui-ci peut après incorporation fournir jusqu'à 40 kilogrammes d'azote par hectare. Le *pigeonpea* joue un rôle très important dans la restauration de la fertilité du sol grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique.

- **Combustible** : Les tiges du *pigeonpea* sont utilisées comme bois de chauffage dans beaucoup de régions dans le monde.

## 1.5 Culture du *pigeonpea*

Tout d'abord on doit distinguer deux systèmes de production existants : le *pigeonpea* en culture traditionnelle et le *pigeonpea* en culture commerciale dirigé vers l'exportation. Dans le premier système l'entretien est minimal, la culture est de type pérenne, la taille de la exploitation est petite (moins de 1 hectare) situé dans les jardins potagers. La récolte est principalement destinée à l'autoconsommation et au marché local.

Le deuxième type de système de production est le commercial en monoculture, semis annuel, la préparation du terrain est mécanisée, les extensions de terrains vont de 1 à 5 hectares.

Par la suite, nous passerons en détail les activités agricoles liées à la culture commerciale du *pigeonpea*.

### 1.5.1 Préparation du terrain

La préparation du terrain se fait soit par labour à plat soit par labour en sillons, soit en défrichant et en brûlant les mauvaises herbes.

### 1.5.2 Les semis

Le *pigeonpea* s'établit bien par semis direct dans un champ bien préparé. Lorsque le terrain est préparé (labour en sillon), le *pigeonpea* est semé sur chaque sillon avec un écartement de 0,40 m.

### 1.5.3 Période de semis

Malgré qu'il s'agisse d'une espèce pérenne, il peut se semer comme une plante annuelle. De préférence au début du printemps pour la récolter fin en fin d'été.

#### 1.5.4 Densité de semis

Pour une bonne mise en place, il est recommandé de semer 2 à 3 graines par poquet. Lorsque cette recommandation est respectée, on peut obtenir au final une densité comprise entre 25.000 à 50.000 tiges de *pigeonpea* par hectare. A titre indicatif, 1kg du *pigeonpea* contient de 5.000 à 14.000 graines.

#### 1.5.5 Entretien du pigeonpea

Une fois établi, il est une des légumineuses les plus tolérantes à la sécheresse, et il peut être développé dans des conditions de pluie ou avec une irrigation minimale (sous des précipitations annuelles de 600 à 1000 millimètres).

Comme la plupart des légumineuses, il ne tolère pas d'inondation mais par contre il peut se développer dans un paysage aride grâce à sa résistance à la sécheresse et aux températures élevées par rapport à la plupart des autres récoltes d'impulsion (Troedson *et al.*, 1990).

#### 1.5.6 Récolte

Après la récolte du maïs, le *pigeonpea* est laissé en champ où il continue son développement jusqu'à la fructification. Les gousses du *pigeonpea* sont récoltées lorsque les graines ont atteint leur maturité physiologique, c'est-à-dire lorsque les graines sont mûres. On reconnaît que les graines sont mûres lorsque les cosses commencent à perdre leur couleur verte. Il est conseillé de récolter les graines au fur et à mesure qu'elles atteignent leur maturité physiologique. Lorsque les gousses séchent en champ, elles éclatent et laissent tomber les graines, ce qui rend la récolte très difficile et occasionne beaucoup de perte.

#### 1.5.7 Post récolte

La post récolte se réalise après la récolte et comprend le séchage, le battage et la sélection du grain sec. Les aires de battage qu'elles soient au champ ou proches des habitations sont toujours préparées avec soin pour éviter tant que possible de polluer les grains par diverses impuretés (sables, cailloux, ...etc), elles sont rarement bétonnées. A proximité des habitations, les aires de battage sont parfois recouvertes de bâches plastiques. Le battage manuel est réalisé à l'aide des bâtons ou encore par foulage au pied.

Après le battage, la paille est récupérée manuellement et sert le plus souvent à l'alimentation du bétail. Le mélange grains – menues pailles qui reste sur l'aire de battage est ensuite récupéré dans des paniers tressés grossièrement qui jouent le rôle de tamis et permettent de séparer les impuretés grossières et le grain. Un dernier nettoyage est ensuite réalisé à l'aide de vans ou de tamis. Ces tâches de pré nettoyage et de vannage sont souvent réalisées par les femmes.

Comme les autres grains, le *pigeonpea* est habituellement conditionné en sacs de 25kg et stocké dans des greniers traditionnels lorsqu'il est destiné à être commercialisé.

Si la récolte vise l'obtention de grain vert, le produit récolté (grains et gousse verts) est transporté immédiatement jusqu'à la plante de transformation, où le battage et la sélection mécanique sont réalisés.

### 1.5.8 Contraintes à la productivité du *pigeonpea*

En raison du type de système de culture : soit la culture traditionnelle, soit la culture commerciale orientée vers l'exportation, les contraintes sont plus accentuées dans une culture commerciale que dans une culture traditionnelle.

Le rendement en champs des fermiers est bas et plusieurs facteurs en sont responsables. Ils continuent à cultiver leurs variétés locales traditionnelles qui fréquemment sont sujettes à différents stress biotiques et abiotiques qui se présentent. Le manque de semences de qualité provoque la baisse de la productivité. Les pratiques culturelles médiocres telles que la basse densité de plantation, basse fertilité du sol, désherbage insuffisant et usage insuffisant et inapproprié de fongicides et d'herbicides sont d'autres facteurs responsables de rendement faibles. Les facteurs environnementales (sécheresse fréquente, érosion du sol avec faible capacité de rétention d'eau) et les facteurs socio-économiques (manque de routes, d'infrastructure de marketing et exploitation par les intermédiaires) affectent aussi la productivité.

Dans une culture de type intensive, les maladies comme : *Le Fusarium* qui est particulièrement présent en Inde et en Afrique de l'est où il cause des pertes de plus de 50% (Marley et Hillocks, 1996), la maladie de la mosaïque de la stérilité (SMD) (Jones *et al.*, 2004). L'insecte le plus nuisible pour le rendement est le lépidoptère *Helicoverpa armigera*. On le retrouve généralement dans les régions tropicales et subtropicales d'Asie. En plus de sa grande diversité de plantes cibles, sa résistance élevée aux insecticides le rend plus difficile à contrôler. La mouche de la gousse de *pigeonpea*, *Melanagromyza obtuse* Malloch, est un autre insecte nuisible majeur du *pigeonpea* qui semble être limité à l'Asie. *Maruca vitrata* (chenille tracteur) est un insecte qui a des conséquences sérieuses sur des légumineuses à grains dans les tropiques et sub-tropiques en raison de sa gamme d'hôtes étendue et des dégâts considérables qu'il crée.

Les contraintes mentionnées précédemment sont importantes dans d'autres régions mais pas au Pérou, ce qui ne veut pas dire que ces problèmes ne pourront se présenter plus tard avec l'intensification de la culture si on ne prend pas de mesures de garde.

## 1.6 Amélioration du *pigeonpea*

L'importance dans les tropiques semi-arides, l'effort de la recherche a été dirigée vers l'amélioration de la récolte ou le transfert de la technologie. Ces dernières années la production du *pigeonpea* est restée stationnaire (Souframanien *et al.*, 2003).

Historiquement, les traits désirables chez *pigeonpea* ont été sélectionnés par des fermiers de "*landraces*" pour s'adapter à leurs systèmes de production et usages. Actuellement un défi important des chercheurs est d'obtenir une production avec moins d'eau. Des récoltes qui ont été considérées comme marginales sont maintenant incorporées dans des programmes d'amélioration. Par conséquent, l'importance d'une légumineuse tolérante à la sécheresse telle que *pigeonpea*, qui combine plusieurs traits désirables, ne peut pas être ignorée.

Le long cycle de vie de la récolte et la structure hétérozygote du génome conservé par pollinisation croisée (jusqu'à 20% selon l'environnement et la présence des insectes pollinisateurs) (Saxena *et al.*, 1990) font que l'amélioration est lente et chère. Dans le sens que le risque de pollinisation croisée implique de prévoir une distance d'écart entre les variétés en étude. De la même façon, le cycle de vie de la récolte qui peut aller de 4 mois pour les variétés précoces à 12 mois pour les variétés tardives font que le coût de maintien de la culture en champ est plus élevé.

Les marqueurs moléculaires sont des séquences d'ADN qui peuvent être aisément détectées et dont la transmission peut être vérifiée. La technologie moléculaire des marqueurs peut faciliter la détermination précise du nombre, de l'endroit chromosomique, des différents effets individuels et des interactions de gènes qui contrôlent des traits (Peleman et Van der Voort, 2003). Un impératif de base à n'importe quel programme d'amélioration moléculaire est le fait de disposer d'un ensemble robuste de marqueurs polymorphes pour l'espèce étudiée. Parmi les différents systèmes de marqueurs disponibles, citons les Séquences Simples Répétées (SSRs) (Burns et d'autres, 2001).

L'ICRISAT a développé la recherche vers la production des lignées mâles stériles cytoplasmiques (CMS) (Saxena et Kumar, 2003; Mallikarjuna et Saxena, 2005) pour la production d'hybrides commerciaux du *pigeonpea*. Une autre approche prometteuse est la sélection assistée par marqueur (MAS) qui a émergé ces dernières années. Le développement des lignées supérieures chez le *pigeonpea* en employant des méthodes conventionnelles est très lent car il s'agit d'une culture pérenne. Chez d'autres légumineuses, les microsatellites ont été employés comme outil pour identifier les gènes principaux et les QTL. Des marqueurs microsatellites liés aux traits quantitatifs tels que la qualité et le rendement en grain (Hyten *et al.*, 2004) ont été publiés. La disponibilité de microsatellites adéquats chez le *pigeonpea* permettrait à des sélectionneurs de localiser l'emplacement de gènes spécifiques et de QTL permettant une amélioration efficace par MAS.

### 1.6.1 Objectifs d'amélioration

Le développement de cultivars du *pigeonpea* résistants ou tolérants a été une priorité élevée dans des programmes de recherche pendant beaucoup d'années. Parmi les cibles importantes d'amélioration pour le *pigeonpea*, on retrouve : le rendement, la précocité, la résistance aux maladies (la mosaïque de la stérilité, *Fusarium wilt* et la rouille due au *Phytophthora*) et aux parasites (le foreur de la gousse et la mouche de la gousse), la sécheresse et l'excès d'eau.

Les premiers efforts d'amélioration ont visé à améliorer le rendement, l'acceptabilité aux utilisations spécifiques et aux systèmes de production. Des sélections ont été faites à partir de variétés locales (*landraces*). L'amélioration de *pigeonpea* peut être faite avec l'utilisation sélective des germoplasmes qui comportent d'excellentes sources de résistance aux maladies et aux parasites et d'autres caractéristiques agronomiques importantes. On doit aussi faire attention à la qualité culinaire de la graine, au fourrage végétal, au contenu protéique et à la taille et la couleur de la graine.

Concernant le rendement, l'amélioration basée sur l'hétérosis (production d'hybrides) a été identifiée comme la meilleure méthode d'amélioration génétique en *pigeonpea*. L'hybridation est facilitée par l'usage du système génétique de stérilité mâle. La disponibilité de la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) dans cette culture a ouvert la possibilité de développer des hybrides commerciaux.

### 1.6.2 L'utilisation des parents sauvages du *pigeonpea*.

On a observé que des parents sauvages possèdent beaucoup de traits agronomiquement importants tels que la résistance aux parasites et aux maladies (Reddy *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2003), la tolérance à la salinité (Subbarao *et al.*, 1991) et le contenu des grains à haute valeur protéique (Saxena *et al.*, 1996), qui seraient utiles dans le *pigeonpea* cultivé.

Beaucoup d'études ont été faites sur l'utilisation des parents sauvages du *pigeonpea*. Plusieurs rapports sur le succès de l'hybridation entre le *pigeonpea* et ses espèces sauvages compatibles dans le pool héréditaire secondaire sont disponibles (Dundas, 1990). De nouveaux types de plants ont été identifiés, issus de croisements interspécifiques impliquant les espèces du pool héréditaire primaire (Ratnaparkhe et Gupta (2007).

L'introggression de germoplasme sauvage a eu comme conséquence le transfert de nouveaux systèmes de CMS (Stérilité Male Cytoplasmique) et le développement de haute valeur protéique, de fleurs cleistogames et de lignées naines du *pigeonpea*. Une ligne naine a été isolée dans un croisement entre le *C. cajan* et le *C. scarabaeoides*. L'utilisation d'espèces sauvages dans les pools héréditaires secondaires et tertiaires a été généralement limitée pour cause de stérilité, de recombinaison restreinte, ou de l'incompatibilité de croisement. Néanmoins, ces espèces sont



extrêmement importantes car elles contiennent des niveaux élevés de résistance à plusieurs stress biotiques et abiotiques importants.

Le sauvetage d'embryons et les techniques de culture de tissus développés pour le *pigeonpea* ont ouvert la perspective d'accéder à des gènes d'autres espèces sauvages dans le pool héréditaire tertiaire.

Des hybrides ont été produits entre le *pigeonpea* et *C. acutifolius*, qui possède la résistance à *H. armigera* (Mallikarjuna et Saxena, 2002). *C. scarabaeoides* qui a la résistance au foreur de la gousse, alors que *C. sericeus* et *C. albicans* sont riches en protéine.

La plupart des espèces de *Cajanus*, particulièrement *C. mollis*, *C. scarabaeoides* et *C. albicans*, ont une teneur plus élevée en protéines (28 à 30%) par rapport au *pigeonpea* cultivé.

Le criblage des espèces sauvages pour la tolérance à la salinité a identifié *C. albicans* et *C. platycarpus* comme plus tolérant que le *pigeonpea* cultivé. Les espèces de *Rhynchosia* ont également plusieurs caractères d'importance agronomique tels que la résistance aux maladies et insectes.

## **1.7 Statistiques de production et de surface cultivée du *pigeonpea***

Selon l'ICRISAT (2008), en termes de production globale de légumineuses à grain, il occupe la sixième place après le haricot (*Phaseolus vulgaris*), petits pois (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*), fèves (*Vicia faba*), et lentilles (*Lens culinaris*). Le *pigeonpea* est un composant important des systèmes de culture des tropiques semi-arides, il est développé sur environ 5.25 millions d'hectares, produisant 3 millions de tonnes. Il est cultivé comme une plante annuelle ou semi pérenne, habituellement utilisée dans les systèmes de culture mixte ou intercalaire en raison de sa lente croissance initiale, permettant à la récolte de l'autre culture, habituellement une céréale de se développer sans encombrement et sans impact négatif sur la récolte principale. En Asie, le *pigeonpea* est fréquemment intercalé avec le sorgho ou le millet, alors qu'en Afrique il est souvent intercalé avec le maïs. En plus des céréales, le *pigeonpea* est également intercalé avec d'autres légumineuses ainsi qu'avec des récoltes de racines et de fibres. En Amérique Latine il se cultive en monoculture et aussi en association avec le maïs.

Selon les statistiques de FAOSTAT (2008), les pays où on trouve la plus grande surface cultivée de *pigeonpea* en Asie sont l'Inde, le Myanmar et le Népal. En Afrique : le Kenya, le Malawi, l'Uganda, la Tanzanie et le Congo. En Amérique : le République Dominicaine, Haïti, le Panama, le Venezuela, la Jamaïque, Trinidad et Tobago (tableau 2).

Le Pérou n'est pas repris dans les statistiques FAOSTAT, malgré l'importance de la culture dans le pays et sa surface de culture en croissance. La surface cultivée atteint à 2.500 ha au niveau national.

**Tableau 2** : Principaux pays producteurs du *pigeonpea*.

Pays	Surface cultivée (ha)	Production (tonnes)	Rendement (tonnes)
Porto Rico	165	250	1,52
Bahamas	200	135	0,68
Comores	440	320	0,73
Grenada	520	500	0,96
Trinidad et Tobago	600	1.486	2,48
Philippines	825	1350	1,63
Jamaïque	1.100	1.300	1,18
Bangladesh	1.600	1.000	0,63
Burundi	2.000	1.800	0,90
Venezuela	2.500	2.000	0,80
Panama	4.700	2.250	0,48
Haïti	6.000	2.400	0,40
République Dem du Congo	8.000	5.001	0,63
République Dominicaine	13.000	13.000	1,00
Népal	29.000	26.000	0,90
Tanzanie	68.000	49.000	0,72
Ouganda	84.000	84.000	1,00
Malawi	123.000	79.000	0,64
Kenya	195.307	105.571	0,54
Myanmar	540.000	500.000	0,93
Inde	3.530.000	2.430.000	0,69

Source: FAOSTAT | © FAO Statistics Division 2008 | 13 May 2008

## 2. *Pigeonpea au Pérou*

Le *pigeonpea* peut se cultiver dans toute la côte péruvienne ainsi que dans la forêt amazonienne, les zones de production se situent sur la cote nord du Pérou principalement à *Lambayeque* (**figure 3**). Initialement, il s'agissait d'une culture secondaire cultivée dans les jardins potagers et dans les bordures de plantations; Actuellement sa culture est en croissance et s'intensifie de plus en plus en raison de la grande demande de grains pour la transformation agroindustrielle d'exportation. La culture s'est répandue à toute la côte et dans la forêt amazonienne, elle reste cependant limitée dans ces zones au profit d'autres cultures plus rentables.



**Figure 3** : Situation du Pérou dans le continent Sud-américaine, du Lambayeque dans la région nord du Pérou.

Notre étude se centre dans la région nord et spécifiquement dans le département de Lambayeque où l'activité agroindustrielle est plus développée et où les caractéristiques de salinité et de pauvreté des sols sont plus marquées. C'est là que le *pigeonpea* s'avère le plus compétitif grâce à ses qualités adaptatives à ces types de sols, son intégration aisée dans les systèmes de rotation et sa culture facile. La demande augmente très rapidement grâce à la présence des industries de transformation de la graine. Le manque d'eau caractéristique de cette région ne constitue pas un problème vu que le *pigeonpea* est très résistant à la sécheresse, il constitue une culture très compétitive face aux autres cultures plus exigeantes en intrants et en eau.

Au Pérou, le *pigeonpea* peut être d'un type pérenne, dans lequel la récolte peut durer de 3 à 5 ans (bien que le rendement de la semence chute considérablement après les deux premières années). La récolte est cultivée sur la terre marginale par les fermiers de subsistance, qui cultivent généralement les "*landraces*" traditionnelles de moyenne et de longue durée (5-11 mois). Egalement, le *pigeonpea* peut être de type annuel plus

approprié à la production de grains, dans ce cas, le *pigeonpea* peut être cultivé en monoculture ou cultivé en association avec d'autres récoltes telles que le maïs. Récemment, une variété de *pigeonpea* de courte durée (3-4 mois), la variété Prompex 2000 a été développée.

Traditionnellement, l'utilisation des intrants comme les engrais et pesticides est minimale. Les niveaux de rendement sont bas (moyenne = 700 kg/ha). Les rendements du *pigeonpea* varient considérablement en fonction des endroits, des cultivars, des saisons, et des systèmes de culture. La nature pérenne du *pigeonpea* permet aux fermiers de multiplier les récoltes avec un surplus pour le commerce dans les marchés locaux et internationaux.

On accorde maintenant une plus grande attention à l'amélioration de la production des graines car son prix est en augmentation. Ainsi, au niveau des petits agriculteurs, la culture du *pigeonpea* constitue un moyen essentiel de subsistance, que ce soit pour la consommation alimentaire propre ou pour une commercialisation au niveau local. Par ailleurs, les variétés cultivées de *pigeonpea* s'avèrent, depuis ces quelques dernières années, être un produit d'exportation intéressant.

Toutefois, un des principaux problèmes qui limite le potentiel de production du *pigeonpea* est la disponibilité très réduite d'un stock de semences, si pas certifiées, en tout cas de qualité, la récolte en vert pour l'agro-industrie d'exportation ne permettant pas que le grain arrive à maturité, condition sine qua non pour avoir une graine au potentiel germinatif suffisant pour ensemençer la culture suivante.

Dans le contexte socio-économique péruvien, le *pigeonpea* joue un rôle essentiel sur les plans nutritionnel et économique. En effet, ce pois tient une place importante dans l'alimentation de millions de personnes vu son haut contenu protéique et vu que sa culture constitue une des principales sources de revenus pour les petits agriculteurs. Son intérêt agroalimentaire évident pour l'exportation s'accompagne fort heureusement d'un impact positif de sa culture sur la conservation des sols : cette légumineuse comme toutes les autres, a un effet favorable sur les caractéristiques physiques et chimiques du sol. Toutefois, le manque de recherche et de promotion dans les domaines des nouvelles variétés, des techniques de caractérisation variétale, de conservation et d'utilisation du germoplasme constituent les principales contraintes empêchant l'augmentation de la surface cultivée et de la productivité du *pigeonpea*.

La recherche régionale du *pigeonpea* existe aussi au Brésil où la plante est principalement utilisée comme aliment pour le bétail ainsi qu'en Inde où le *pigeonpea* est intensément cultivé, les conditions agronomiques et socio-économiques y sont très différentes. On récolte plutôt les grains secs alors qu'au Pérou, il s'agit d'une récolte de grains verts.

## 2.1 L'introduction du *pigeonpea* dans la région nord du Pérou

Nous avons discuté dans la partie précédent du choix du Lambayeque comme zone d'étude, dans cette partie nous aborderons l'introduction du *pigeonpea* dans la région ; ensuite, nous parlerons de la variabilité des *landraces* des *pigeonpea*, de la agriculture traditionnelle et finalement de quelques chiffres de production et de surface cultivé.

Van der Maesen, (1990) considère l'Inde comme le centre d'origine du *pigeonpea* et l'Afrique de l'Est, où la récolte a été développée pendant au moins 4000 ans, comme un centre secondaire de diversité (Milind *et al.*, 2007). Puis au moyen du commerce d'esclaves, il se serait étendu au continent américain. L'arrivée des européens en Amérique (1492) fut le début d'une nouvelle étape pour l'agriculture dans le monde entier. La pomme de terre, le maïs et la tomate ont changé les schémas agricoles du vieux monde. En Amérique, le blé, l'orge, le sorgho, le riz, la fève, le soja, la pastèque, et le *pigeonpea* parmi eux, se sont incorporés dans les habitudes de consommation.

Le *pigeonpea* serait entré dans le continent américain peu après le début de la conquête espagnole. A ce propos Verschueren (1992) dans son étude morphologique et taxonomique, comprenant les départements de Tumbes et Piura (au nord du Lambayeque), propose une reconstruction hypothétique de son introduction dans la région à partir de l'histoire agricole régionale et à partir de la distribution de la variabilité génétique observée dans son étude, que nous le discuterons par la suite.

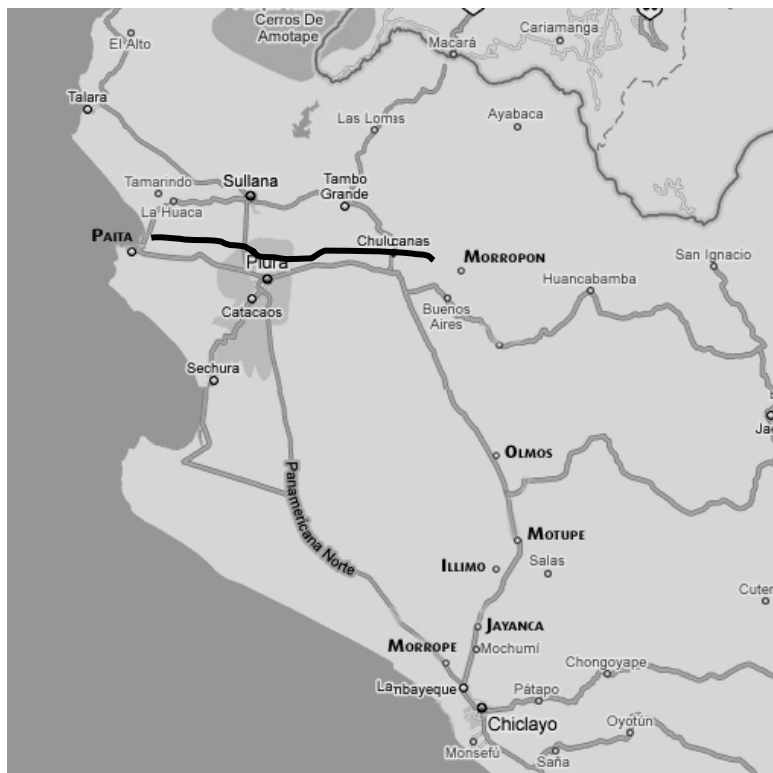
### 2.1.1 L'hypothèse de Verschueren

Verschueren (1992) signale que les départements du nord du Pérou ont soufferts à l'époque du colonialisme d'une éradication quasi totale de la culture préhispanique, exprimée par l'élimination de la culture et de la population indigène. L'absence de main d'œuvre avait requis l'importation d'esclaves d'Afrique. Ils sont arrivés par le port de Paita à Piura et de là ils ont été conduits aux haciendas de Piura bas jusqu'au *Morropón* (**figure 4**).

Verschueren souligne une relation possible entre l'introduction de l'esclavage et la haute variabilité génétique du *pigeonpea*. Cela s'explique par le fait que les esclaves ont amené des grains de *pigeonpea* de diverses régions de l'Afrique au nouveau monde. Dû à l'usage dans l'alimentation, la graine a été emportée lors du voyage, échangé et cultivé pour les immigrants. Postérieurement, le *pigeonpea* s'est répandu vers le sud, dans le département de *Lambayeque* et sur toute la côte. Il a atteint en montagne jusqu'à 1 500 à 2 000 m d'altitude.

L'étude citée, se base sur la variabilité trouvée et conclut que le noyau génétique de l'espèce pour cette région se trouve en *Morropón*. L'auteur considère qu'il doit s'agir d'un des centres d'introduction et de diffusion de l'espèce au Pérou.

La distribution de la variabilité génétique trouvée par Verschueren (1992) dans son étude indique une faible variabilité à Piura bas. Cette variabilité s'exprime par la couleur de la fleur et une variabilité presque nulle pour la forme de la gousse et la couleur primaire et secondaire de la graine. Par contre dans la province de *Morropón* (bassin du haut Piura) on observe une haute variabilité pour la couleur de la fleur, la couleur et la forme de la gousse et la couleur primaire et secondaire de la graine, la forme de la feuille, la précocité, la résistance et le rendement. Cette variabilité peut s'expliquer par le comportement des paysans dans cette zone par rapport aux semences de ces cultures. Ils ne les sélectionnent pas en fonction de leur couleur comme le font les paysans de la côte. Au contraire ils préfèrent conserver la diversité existante.



**Figure 4 :** Trajectoire d'introduction du *pigeonpea* selon la hypothèse de Verschueren dans le nord du Pérou.

### 2.1.2 La variabilité des *landraces* du *pigeonpea*

Le plus surprenant est la variabilité de cette espèce dans la région nord du Pérou, loin de son centre d'origine. Cela pourrait s'expliquer par une large base génétique et parce que le *pigeonpea* n'a pas été ou a très peu été sélectionné. De même les conditions naturelles, c'est à dire les conditions géographiques et climatiques, qui font justement des Andes une zone de diversification naturelle ont maintenu cette diversité.

A l'heure actuelle, cette diversité se voit menacée par la croissance de la demande pour l'agro-industrie d'exportation de grain vert et par la multiplication de quelques variétés améliorées précoces mais qui demandent un niveau élevé d'intrants.

L'établissement à Lima d'une collection du *pigeonpea* caractérisée devrait contribuer à la valorisation des *landraces* adaptées. La collecte des ressources naturelles n'est pas une fin en soi, mais elle permet la conservation des espèces menacées et en même temps la mise à disposition de matériel génétique pour les besoins d'amélioration et de sélection. Cette collection pourra également s'utiliser dans la production de nouvelles variétés de *pigeonpea*. Grâce à ces nouvelles variétés on devrait pouvoir étendre la surface cultivée à des régions plus sèches, dans des sols présentant des problèmes de salinité et en raccourcissant le cycle de la culture.

### 2.1.3 L'agriculture traditionnelle

Les petits paysans de notre zone d'étude conservent les pratiques de l'agriculture traditionnelle. Ils préfèrent cultiver les *landraces* de *pigeonpea* face aux cultivars modernes. Ces derniers plus précoces, ne correspondent pas à leurs besoins. Les paysans préfèrent les *landraces* plus tardives, parce qu'elles leur procurent une production continue pour leur alimentation et pour la vente sur le marché local. Egalement les *landraces* sont plus rustiques, tolèrent le manque d'eau, élément restreint dans cette zone de culture. De la même façon, les agriculteurs ne les fertilisent pas, ils n'ont pas besoin d'augmenter ses coûts de production. Ils peuvent l'intercaler avec d'autres cultures ou les semer en bord de plantations. Dans ce contexte, les variétés modernes ne leur procurent pas plus d'avantages que les *landraces* traditionnelles. Hardon et de Boef (1993) signalent que les fermiers rejettent des variétés modernes parce qu'elles ne répondent pas à leurs exigences et donnent la préférence aux *landraces* locales. Les programmes de recherche doivent prendre en compte les habitudes et pratiques de l'agriculture traditionnelle pour qu'une variété soit acceptée par les agriculteurs.

### 2.1.4 Statistiques de production et de surface cultivée du pigeonpea

Selon les statistiques du Ministère de l'agriculture du Pérou, dans le département de *Lambayeque*, la surface cultivée atteint 1 370 ha (**tableau 3**), principalement des petites exploitations ou des cultures en association.

Toutefois, en période " El Niño ", qui provoque des pluies intenses, l'humidité résiduelle du sol permet la culture des légumineuses dans de nouvelles zones qui accroissent la surface cultivée. En 1998, la surface cultivée des légumineuses a augmenté de 300%.

**Tableau 3** : Surface cultivée du *pigeonpea* dans le département de *Lambayeque*.

District	Surface cultivée (ha)	Production (tonne)
Motupe	398	996
Jayanca	315	788
Tucume	155	388
Illimo	115	288
Pacora	115	287
Olmos	110	275
Morrope	78	123
Salas	46	115
Chochope	17	43
Mochumi	15	38
Lambayeque	6	15
Total	1 370	3 356

Source OIA Ministère de l'agriculture du Pérou 2005

On observe un rendement moyenne de 2.5 tonnes par hectare sauf à *Morrope* où le rendement est de 1,5 tonnes par hectare en raison des sols plus pauvres. Par rapport au rendement des autres pays qui va de 0,4 (Haïti) à 2.4 (Trinidad et Tobago) le rendement du *pigeonpea* au Pérou est haut, certainement dû au fait que la récolte est orientée vers les grains vert, où on peut compter plusieurs récoltes sur un même pied de plante. Une autre explication de la différence de rendement est l'utilisation des systèmes de productions différents, au Pérou par irrigation en absence de pluie et dans certains pays d'Afrique, par exemple, en présence de pluie. Au Pérou la plante ne développe pas un feuillage exubérant, ce qui peut expliquer le comportement plus précoce de la plante et un semis d'une plus haute densité (33.000 plantes par hectare).



### **3. Caractérisation de la variabilité de pigeonpea**

Si nous analysons une espèce donnée nous pourrions observer qu'il n'existe pas deux individus ayant identiquement les mêmes caractéristiques phénotypiques: l'individu est unique. Si on peut observer l'absence de variations pour certains caractères essentiels, il existe toujours de nombreux caractères pour lesquels des variations entre individus sont observées. Certaines de ces variations s'expriment au niveau phénotypique (morphologie, physiologie, etc.) mais les autres restent "cachées" et leur mise en évidence nécessite l'utilisation de techniques adaptées (variabilité des protéines ou des séquences d'ADN).

Les variations du phénotype sont dues en partie à des facteurs environnementaux (fertilisation, climat, etc.) et d'autre part à des différences entre les génotypes, transmissibles à la descendance. De plus, dans la plupart des cas, ces deux causes de variation interagissent fortement (interactions génotype-environnement), et il est difficile de mesurer leur part relative dans la variation phénotypique totale. Les méthodes classiques pour estimer la diversité génétique des populations utilisent les caractères morphologiques et agronomiques, en sachant que ces caractères peuvent être influencés par des facteurs environnementaux.

Dans le but de caractériser une collection les deux approches peuvent être envisagées l'approche phénotypique et l'approche génotypique.

#### **3.1 Caractérisation phénotypique**

L'expression de la variabilité peut ou non se manifester en caractères visibles. La variabilité qui s'exprime par caractères visibles s'appelle phénotypique. Dans le processus de caractérisation phénotypique d'une collection, on peut avoir comme but de mesurer la variabilité du groupe étudié ou d'établir la représentativité de la collection en relation à la variabilité de l'espèce dans la région ou la variabilité totale de l'espèce. Si l'objectif principal est de mesurer la variabilité du groupe, il est recommandable de sélectionner des caractéristiques ou descripteurs qui soient les plus discriminants possibles.

##### **3.1.1 Descripteurs**

Un descripteur végétal est une caractéristique identifiable et quantifiable d'une espèce. Les descripteurs sont utilisés dans la caractérisation et dans l'évaluation des populations pour faciliter leur différenciation et rendre facile la classification, le stockage, la récupération et l'utilisation de données (Painting *et al.*, 1993).

Les descripteurs morpho-agronomiques peuvent être qualitatifs ou quantitatifs et incluent des caractères botaniques et taxonomiques mais aussi d'autres qui n'identifient pas nécessairement l'espèce mais qui sont importants du point de vue agronomique, de l'amélioration génétique, du

marché ou du point de vue culinaire. Parfois on inclut aussi des descripteurs indicateurs des composantes de rendements avec l'objectif de donner au sélectionneur une indication du potentiel du rendement. Souvent ces descripteurs sont influencés par les changements environnementaux.

La publication de nombreux descripteurs de caractérisation par l'International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), pour les espèces végétales, témoigne de l'importance des marqueurs morphologiques. Ces caractères sont néanmoins souvent le résultat d'une interaction entre le génotype et le milieu. Plusieurs caractères phénotypiques sont gouvernés par un ou plusieurs gènes et sont plus ou moins influencés par les conditions de l'environnement. Ainsi, un même génotype peut donner lieu à des phénotypes différents en fonction de conditions environnementales alors qu'un même phénotype peut être le résultat de l'expression des différents génotypes.

### 3.1.2 Descripteurs du *pigeonpea*

Les descripteurs du *pigeonpea* publiés par l'International Board for Plant Genetic Resources – IBPGR (now International Plant Genetic Resources Institute – IPGRI) et l'Institut international de recherche sur les cultures dans les zones tropicales semi-arides (ICRISAT) en 1993, sont utilisés dans les caractérisations morphologiques quantitatives et qualitatives du *pigeonpea*. Ces descripteurs, mondialement utilisés, sont complétés avec des caractères établis par les sélectionneurs locaux. L'intérêt est d'uniformiser la caractérisation des collectes pour la conservation et la rationalisation de l'utilisation du germoplasme. Pour choisir parmi les caractères analysés, les plus faciles à identifier, simples à mesurer et discriminants, deux contraintes peuvent se présenter : l'influence de l'environnement, et la mesure à des stades précis du cycle végétatif.

Upadhyaya *et al.*, (2005), dans l'étude de la diversité des caractéristiques qualitatives et quantitatives d'une collection de *pigeonpea* ont analysé la variation de 14 traits qualitatifs et de 12 quantitatifs dans 11.402 accessions de germoplasme de *pigeonpea* de 54 pays, qui ont été groupés dans 11 régions. Dans cette étude l'habitude de croissance inclinée, la couleur verte de la tige, le type de floraison indéterminée et la couleur jaune de la fleur étaient prédominants parmi les traits qualitatifs. De même, la couleur du grain a eu la variabilité maximale. La couleur orange suivie de la couleur crème était les deux couleurs de grain les plus fréquentes dans la collection.

Dans le même étude, les accessions du germoplasme d'Océanie étaient caractérisées par leur courte durée de croissance, leur petite taille, le peu de branches, des gousses avec peu de grains, leur plus petite taille de grain et de faibles rendements en grains. Les accessions d'Afrique étaient plus tardives, d'une taille plus grande, avec des gousses multi grains et de plus grands grains. La diversité de germoplasme indiquée par l'index de diversité de Shannon-Weaver pour tous les traits, était la plus haute pour l'Afrique ( $0.464 \pm 0.039$ ) et la plus basse pour Océanie ( $0.337 \pm 0.037$ ). L'analyse de clusters basée sur trois composantes principales employant 12

traits quantitatifs a indiqué la formation de trois clusters: le cluster 1 inclut des accessions d'Océanie ; le cluster 2 d'Inde et des pays limitrophes ; et le cluster 3 groupe les accessions d'Indonésie, de Thaïlande, des Philippines, d'Europe, d'Afrique, d'Amérique et des pays des Caraïbes.

Postérieurement, Manyasa *et al.* (2008) dans l'étude de la diversité des *landraces* de *pigeonpea* en Tanzanie ont rassemblé un total de 123 *landraces* de *pigeonpea* de quatre secteurs principaux de production. Les accessions ont été caractérisées par leur diversité de 16 traits qualitatifs et de 14 quantitatifs. Une variabilité significative des traits qualitatifs a été enregistrée dans la couleur principale de la fleur, la couleur de la gousse, le type de floraison, le patron des stries, la couleur des grains et la forme des grains.

Dans cette étude, les collections nordiques de montagne ont montré la plus basse diversité due probablement à une réponse de la sélection des variétés sur des caractéristiques préférées pour le marché. Les analyses des composantes principales et l'analyse de clusters ont séparé la variabilité du germoplasme basée sur les jours à la floraison, les jours à la maturité, la hauteur de la plante, le nombre de branches primaires et secondaires et le nombre de grappes par plante. De façon générale, deux clusters étaient évidents avec des accessions côtières, orientales et méridionales dans un cluster et des accessions nordiques de montagne dans l'autre cluster.

Egalement, plusieurs études brésiliennes de caractérisation de génotypes de *pigeonpea* (Wutke, 1987), mettent en évidence la grande variabilité de cette espèce. Godoy *et al.*, (1994,1997) ont évalué agronomiquement deux collections de germoplasme de *pigeonpea* et ont vérifié que toutes les accessions sélectionnées présentaient, à des degrés divers, des mélanges physiques et/ou des ségrégations phénotypiques. Ainsi, les accessions sélectionnées par des caractéristiques fourragères favorables sont passées par des processus d'autofécondation pour l'obtention de lignées pures.

De 1998 à 2003, Godoy *et al.*, (2003) ont réévalué 17 de ces lignées afin de confirmer les performances morphologiques et agronomiques de celles-ci. Par la suite, Godoy *et al.*, (2004) ont caractérisé et décrit 11 de ces lignées pures. La description a été effectuée sur base des descripteurs internationalement acceptés pour l'espèce (IBPGR, 1993) et ils en ont conclu que les 11 lignées ont présenté des caractéristiques morphologiques distinctes, par lesquelles elles peuvent facilement être identifiées.

Au Pérou, Verschueren (1992) a réalisé une étude morphologique et taxonomique du *pigeonpea* à Piura, département du nord du Pérou. Dans cette étude il met en évidence la haute variabilité génétique du *pigeonpea*, malgré son origine exo-américaine. Ainsi, il considère comme caractéristiques importantes : la forme des folioles, la couleur de la corolle, la forme de la gousse, la forme de la graine, la couleur et la couleur secondaire de la graine et le type d'inflorescence. Bautista et Camarena (1996) ont réalisé une caractérisation de 16 accessions d'origine équatorienne à l'aide de descripteurs de précocité et de rendement, celle-ci a permis de développer une variété à partir de la famille la plus performante,

avec 108 jours à floraison, 156 jour à maturité de récolte et 53% de rendement de grains secs à la première récolte (1,2 tonne par hectare) et un poids de 100 graines de 18gr.

## 3.2 Caractérisation moléculaire

Dans cette partie nous parlerons d'abord des marqueurs moléculaires, ensuite nous parlerons des marqueurs microsatellites, de leurs avantages et de leurs inconvénients. Par la suite, nous présenterons la caractérisation moléculaire du *pigeonpea*, basée sur les microsatellites. Finalement nous parlerons des applications potentielles des microsatellites chez le *pigeonpea*.

### 3.2.1 Marqueurs moléculaires

Une nouvelle génération de marqueurs est apparue pendant les deux dernières décennies, qui a révolutionné le domaine de la génétique moléculaire. Depuis leur développement, ils ont été constamment modifiés pour augmenter leur utilité et pour permettre l'automatisation de l'analyse du génome (Joshi *et al.*, 1999). Les marqueurs moléculaires basés sur l'ADN sont des outils versatiles dans divers champs comme la taxonomie, la physiologie, l'embryologie, la génétique, etc.

La majorité des stratégies de marquage moléculaire détecte des mutations ponctuelles de la séquence d'ADN (comme par exemple les techniques : AFLP Amplified fragment length polymorphism, RFLP Restriction fragment length polymorphism ou SNP Single nucleotide polymorphism), ou bien des modifications du nombre de copies de motifs répétés très courts de type microsatellites.

Ces marqueurs ADN offrent plusieurs avantages par rapport aux marqueurs phénotypiques traditionnels, ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante. Ces marqueurs moléculaires deviennent aujourd'hui un outil essentiel d'amélioration des plantes et ouvrent de nouvelles perspectives pour le sélectionneur.

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Un marqueur idéal doit être à hérédité simple, multi-allélique et co-dominant. Le choix des marqueurs peut également porter sur leur neutralité, ils sont neutres s'ils ne produisent aucun changement aux caractères métaboliques ou phénotypiques et, par conséquent, ne sont pas sujets à une sélection positive, négative ou équilibrée. Les marqueurs neutres et codominants sont nécessaires pour analyser la structuration des populations (effet de fondation, dérive génétique).

Ces marqueurs moléculaires sont des indicateurs de la variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre familles, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus. Ainsi, les marqueurs moléculaires sont des outils très efficaces pour la phylogénie

moléculaire puisqu'ils peuvent établir des relations de parenté entre individus. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'applique à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendant des conditions de l'environnement. En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité et le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN.

Les marqueurs moléculaires sont d'une grande importance pour l'amélioration des cultures à valeur agronomique et dans les programmes de sélection assistée par marqueurs (MAS) (Dekkers, Hospital, 2002). Ainsi les schémas de sélection sont accélérés puisque le sélectionneur peut détecter l'allèle d'intérêt par la présence du marqueur avant même l'expression du phénotype.

Les marqueurs moléculaires ont de nombreuses applications en génétique des plantes. Ils permettent d'observer le polymorphisme des séquences de l'ADN d'un certain nombre de sites ou de locus répartis sur le génome. Les séquences ciblées correspondent ou non à des séquences codantes. Parmi les applications des marqueurs moléculaires, on retrouve:

- L'utilisation comme empreinte génétique pour la caractérisation du génotype d'un individu, permettant de l'identifier. En même temps, on peut déterminer leur structure génétique d'une population, ou identifier les doubles dans la collection
- L'association d'un caractère quantitatif avec un marqueur moléculaire (QTLs). Le génotype du marqueur peut renseigner, bien avant que l'on puisse le voir, sur le phénotype du caractère quantitatif qui nous intéresse.
- Après un croisement entre une variété élite et une variété possédant un gène d'intérêt, de rétro-croisements avec la variété élite, peuvent se réaliser afin de garder uniquement les gènes d'intérêt dans le génome de la variété élite. Grâce aux marqueurs moléculaires, on peut sélectionner les plantes possédant les marqueurs les plus proches des gènes d'intérêt.
- La détermination des groupes de liaison: à partir du taux de recombinaison de deux marqueurs, il est possible de déterminer si ceux-ci sont sur le même chromosome et à quelle distance l'un de l'autre. Egalement dans la cartographie des gènes, basée sur le calcul du taux de recombinaison entre un marqueur et un gène.
- Dans la génétique des populations qui est l'étude de la diversité génétique au sein d'une population.

### 3.2.2 Simple Séquence Répétée (SSR)

Les marqueurs simple séquence répétée (SSR), également connus sous le nom de microsatellites sont des séquences d'ADN, constituées de répétitions en tandem de motifs mono- di-, tri- ou tétra nucléotidiques localisées dans une région codante ou non codante du génome chez les procaryotes (Tautz, 1989) et chez les eucaryotes (Zane *et al.*, 2002).

Les plus courants sont (A)<sub>n</sub>, (TC)<sub>n</sub>, (TAT)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, etc. Leur valeur de "n" peut aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Un microsatellite donné peut être présent en des milliers d'exemplaires dans le génome d'une espèce. Chez les végétaux supérieurs, on estime qu'il y aurait en moyenne un microsatellite di-nucléotidique tous les 30 à 100 kb.

Selon Pupko et Graur (1999), tout nombre de répétitions en tandem d'une certaine combinaison de nucléotides peut être considérée comme un microsatellite. Ces répétitions sont présentes dans des régions codantes et non codantes (Hancock, 1995) et sont habituellement caractérisées par un degré élevé de polymorphisme de longueur (Zane *et al.*, 2002) (**figure 5**).

Le polymorphisme très élevé de ces *loci* est dû à des variations dans la longueur de la répétition. Cette longueur identifie les allèles de chacun de ces *loci*. Chaque microsatellite correspond à un locus unique dans le génome, parfaitement défini par les séquences uniques qui encadrent la répétition.

Les microsatellites sont devenus des marqueurs génétiques importants en recherche génomique végétale. Les SSR sont particulièrement attirants pour distinguer les cultivars parce que le niveau de polymorphisme détecté aux loci microsatellites est plus élevé que pour n'importe quel autre marqueur moléculaire. Ils sont également des marqueurs moléculaires codominants et spécifiques.



**Figure 5 :** Séquences contenant une répétition GT<sub>n</sub>.

Les microsatellites développés avec de l'ADN génomique peuvent appartenir à des régions codantes ou non codantes. Deux types de microsatellites ont été décrits: Dans le type I, les marqueurs sont localisées au sein des gènes de fonctions connus et sont utiles pour la cartographie comparative afin d'étudier l'évolution du génome (Vignal *et al.*, 2002). Le

type II est sans fonction connue. Le type I est relativement rare et généralement moins polymorphe que le type II. La détection des marqueurs situés dans des gènes et ESTs donne la possibilité de convertir les marqueurs du type II en type I.

Les *loci* microsatellites sont en soi instables avec des taux élevés de mutation, un phénomène provoqué par glissement de l'ADN polymérase et/ou une recombinaison inégale (Li *et al.*, 2002). En raison de leur mutabilité élevée, les microsatellites jouent un rôle significatif en tant que marqueurs moléculaires pour des études de génétique évolutive et de populations.

Deux hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'évolution du nombre de répétitions dans un microsatellite. Le premier modèle, appelée « slippage replication » a été décrit par Levinson et Gutman en 1987 (**figure 6**). Ce modèle est composé de trois étapes :

**Etape d'initiation** : la polymérase synthétise le brin complémentaire de la séquence répétée.

**Etape de dissociation** : le brin nouvellement synthétisé se dissocie du brin matrice pendant que la polymérase traverse la région répétée.

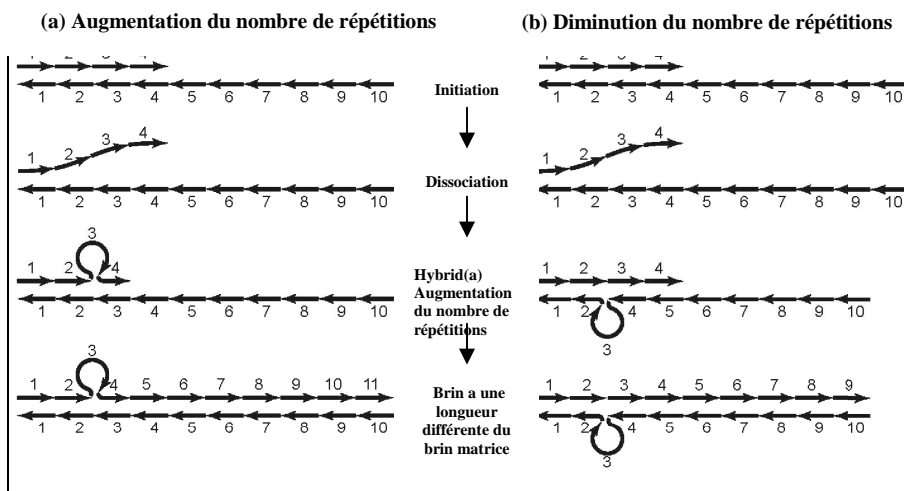
**Etape de rehybridation et erreur d'alignement** : deux cas sont possibles : L'ajout d'une unité de répétition : l'extrémité 3' du brin nouvellement synthétisé se réhybride avec un région complémentaire en amont du brin matrice. Il y a ainsi formation d'une boucle dans le nouveau brin. La polymérase va donc ajouter une unité de répétition supplémentaire. La deuxième hypothèse est la suppression d'une unité de répétition : ce mécanisme est presque identique à l'ajout d'une unité à la différence que la boucle se fait au niveau du brins matrice. La polymérase synthétisera donc une répétition en moins.

Le deuxième modèle de mutation est le *crossing-over* ou la recombinaison inégale entre deux chromosomes homologues (ou entre deux chromatides soeurs) pendant la méiose. Il résulte de ce *crossing-over* une insertion sur un des chromosomes et une délétion sur l'autre (Li, Lassner et autres 2002).

### 3.2.2.1 Avantages des microsatellites

Leur distribution sur l'ensemble du génome, leur polymorphisme extrêmement élevé du nombre de répétitions, leur spécificité de locus, leur caractère co-dominant (on peut distinguer l'homozygote et l'hétérozygote) et leur simplicité d'utilisation une fois leur mise au point effectuée, fait d'eux d'excellents marqueurs génétiques.

Les microsatellites sont fortement reproductibles, fortement polymorphes, basés sur la PCR, ils ne nécessitent que de petites quantités d'ADN (Edwards *et al.*, 1996). De même les microsatellites sont de nature multi-allélique, de transmission co-dominante, ils se retrouvent en abondance relative (Zane *et al.*, 2002).



**Figure 6 :** Modèle de “slippage réplication” permettant d’expliquer l’augmentation ou la diminution du nombre de répétitions dans un microsatellite (Ellegren, 2000).

### 3.2.2.2 Désavantages des microsatellites

Le coût et le temps requis pour leur développement sont une limitation importante. La procédure traditionnelle d'isolement de microsatellites implique le clonage de petits fragments d'ADN génomique et le criblage des clones par hybridation avec des sondes contenant des répétitions (Powell *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). Ce procédé fonctionne bien pour les espèces qui ont beaucoup de microsatellites mais pas pour celles qui sont pauvres. Dans le but d'augmenter les chances de succès, on a proposé l'utilisation de banques enrichies et celles qui ont été basées sur l'hybridation sélective ont été les plus réussies. (Karagoyozov *et al.*, 1993; Billotte *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1996).

### 3.2.3 Caractérisation moléculaire en *pigeonpea*

L'électrophorèse de protéine et d'isozyme a été employée pour estimer la variabilité chez des cultivars de *pigeonpea* (Kollipara *et al.*, 1994). La limitation principale de ces techniques est le faible polymorphisme détecté parmi des cultivars étroitement liés. *Pigeonpea* est l'une des exceptions parmi des légumineuses à grain parce qu'il a une tendance à l'allogamie. En raison de l'allogamie, les cultivars sont hétérogènes pour plusieurs caractères agronomiques importants. Le maintien du germoplasme chez le *pigeonpea* étant difficile, l'identification des accessions par marqueurs moléculaires sera utile et permettra d'évaluer la pureté et la stabilité des génotypes dans le programme de multiplication.

Le potentiel de marqueurs RFLP, RAPD, et de marqueurs microsatellites a été exploité dans des études génétiques de diversité chez le *pigeonpea* Nadimpalli *et al.* (1993) Ces études se sont avérées utiles dans la classification de la biodiversité existante parmi les espèces



sauvages, qui peuvent être encore exploitées dans des programmes d'introgression de gènes. (Ratnaparkhe et Gupta, 2007).

### 3.2.3.1 Caractérisation moléculaire basée sur les microsatellites

Chez le *pigeonpea*, Burns et al, 2001) ont développé 20 amorces microsatellites, dont seulement 10 se sont montrés polymorphes dans le germoplasme cultivé du *pigeonpea*. Dans cette étude des sondes (CA)<sub>15</sub> et (CT)<sub>15</sub> ont été employées. Le criblage de microsatellites polymorphes a été conduit sur un ensemble de 12 accessions de *pigeonpea* en utilisant 20 paires d'amorces dérivées des séquences obtenues.

Postérieurement au démarrage de notre étude, Odeny, 2007 a publié 20 amorces microsatellites, dont 19 paires ont produit des amplifications polymorphes parmi 15 accessions du germoplasme sauvage et cultivé, ce qui prouve le transfert de gènes possible entre les espèces du genre *Cajanus*.

Chez *Glycine max* (soja) plus de 1000 loci microsatellites ont été étudiés (Song et al., 2004), chez *Cicer arietinum* L. (*pois chiche*), environ 400 loci microsatellites (Lichtenzveig et al., 2005), chez *Phaseolus vulgaris* L. (l'haricot commun), plus de 100 (Blair et al., 2003) et aussi chez *Arachis hypogaea* L. (arachide) (Ferguson et al., 2004).

Le développement des loci microsatellites chez le *pigeonpea* est censé faciliter l'évaluation rapide du flux de gènes entre les populations, permettant de surveiller son taux d'érosion génétique, et le développement de stratégies d'évaluation des risques qui sont exigées avant que n'importe quel *pigeonpea* transgénique puisse être développé.

### 3.2.3.2 Applications potentielles des marqueurs microsatellites chez le *pigeonpea*

On peut envisager d'utiliser les microsatellites sur le *pigeonpea* pour déterminer leur origine géographique. Certains auteurs signalent l'Inde, comme centre d'origine, à cause de la présence de plusieurs parents sauvages, la grande diversité de *pigeonpea*, quelques restes archéologiques et l'utilisation large en cuisine quotidienne (Van der Maesen, 1983). Cependant, d'autres auteurs (Rachie et Roberts, 1974) ont considéré l'Afrique comme le centre d'origine, vu la présence de graines de *pigeonpea* dans des tombeaux égyptiens et des espèces sauvages (*Cajanus kerstingii*) en Afrique occidentale.

Les microsatellites pourront aussi s'utiliser dans l'identification du génotype et de la diversité génétique. Les études morphologiques seules ne fournissent pas d'informations suffisantes pour comprendre la diversité génétique des espèces ni leur parenté avec d'autres espèces. L'analyse moléculaire par microsatellites pourra fournir des informations additionnelles sur la diversité génétique utile dans les programmes d'amélioration pour le choix des parents (Charcosset et Moreau, 2004).

Le développement de locus SSR chez le *pigeonpea* est censé faciliter l'évaluation du flux de gènes entre les populations, permettant de surveiller son taux d'érosion génétique, et le développement de stratégies d'évaluation des risques qui sont exigées avant que n'importe quel *pigeonpea* transgénique puisse être développé.

Le développement d'hybrides de *pigeonpea* demande aussi une identification précoce des lignes pures qui peuvent produire des hybrides hautement hétérozygotes.

D'autres aspects comme la certification de semence, le droit d'obtention des variétés, et la description et protection du germoplasme de *pigeonpea* bénéficieraient aussi de la disponibilité de microsatellites adéquats.

Une autre utilisation des microsatellites est l'élaboration d'une carte moléculaire de liaison et de *synténie* (groupe de liaison conservé entre deux espèces). Le manque d'un nombre suffisant de marqueurs moléculaires a limité son élaboration chez le *pigeonpea*. Les microsatellites sont les marqueurs plus adéquats pour le développement d'une carte de liaison de *pigeonpea* vu la complexité génétique des populations et les niveaux élevés d'hétérozygotie dans différents génotypes. Ce type de marqueur a déjà été utilisé dans d'autres espèces à cette fin, chez le soja (Song *et al.*, 2004), chez le haricot commun (Blair *et al.*, 2003) et chez le petit pois (Loridon *et al.*, 2005).

Des niveaux plus élevés de *synténie* ont été observés entre le haricot commun, le mungbean, et le soja (Lee *et al.*, 2001) et également entre le soja et *Medicago* (Mudge *et al.*, 2005). Une étude chez le *pigeonpea* qui appartient à la même tribu *Phaseolae* peut être envisagée sans problème.

Chez le *pigeonpea*, aucun programme de sélection assistée par marqueurs moléculaires efficace n'a été développé jusqu'à présent. La génétique de la plupart des traits importants est inconnue. Il existe donc un besoin de développer un ensemble de marqueurs polymorphes robustes, et cette étude a contribué à la recherche de ces outils moléculaires.

#### **4. Analyse de la diversité génétique**

Tout d'abord, nous aborderons la diversité génétique dans le sens le plus large, ensuite nous verrons comment cette diversité s'érode et comment elle se conserve dans des systèmes d'agriculture traditionnelle. Finalement, nous décrirons les paramètres intra et inter populations couramment utilisés dans ce type d'analyses.

## 4.1 Diversité génétique

Les ressources génétiques représentent un patrimoine qu'il est nécessaire de préserver et de mieux connaître afin de mieux l'utiliser. Ainsi, la collecte, la caractérisation et la conservation de ces ressources sont des activités de recherche indispensables à la création des variétés de demain. (INRA). Chez les végétaux, il existe non seulement une abondante diversité des espèces, sauvages ou cultivées (biodiversité), mais également de très nombreuses variantes entre les individus au sein d'une même espèce (variabilité génétique). C'est cette diversité génétique, inter et intra-espèces, qui constitue la matière première du sélectionneur.

Pour chaque culture, il existe un ou plusieurs centres d'origine où cette plante a été cultivée. Il s'agit généralement du centre primaire de diversité *in situ* de cette culture. Le flux génétique ininterrompu entre les cultures et les parents sauvages dans ces régions montre bien leur importance comme source de nouvelle variabilité. Dans certains cas, toutefois, les centres d'origine sont difficiles à définir. Il y a des exemples de domestication de la même plante à différents endroits; ainsi la patate douce (*Ipomoea batatas*) a été domestiquée indépendamment en Amérique centrale et en Amérique du Sud.

Les centres secondaires de diversité sont également très importants pour certaines cultures. Par exemple, une diversité significative des variétés communes de haricot a été produite par les agriculteurs dans les pays d'Afrique depuis que ces espèces ont été introduites d'Amérique latine. Il se serait passé le cas inverse chez le *pigeonpea*.

La FAO dans son rapport sur l'état des ressources phylogénétiques dans le monde déclare que l'agriculture de presque tous les pays est fortement dépendante de ressources venant d'autres régions du monde. Des cultures comme le manioc, le maïs, l'arachide et les haricots, qui proviennent d'Amérique latine mais sont devenues des denrées alimentaires de base dans beaucoup de pays d'Afrique au sud du Sahara, démontrent l'interdépendance des espèces végétales entre les pays en développement.

Même si de nombreux pays possèdent une grande diversité phylogénétique pour l'alimentation et l'agriculture dans leurs banques de gènes et dans les exploitations des agriculteurs, à longue échéance, ils auront probablement besoin d'une diversité supplémentaire provenant de centres de diversité des espèces végétales. Il y a donc un besoin continu d'échange de ressources phylogénétiques.

## 4.2 Erosion et conservation de la diversité génétique

Les rapports nationaux indiquent que l'appauvrissement récent de la diversité a été important et que le processus d'érosion se poursuit. A cet égard, la perte irréversible d'allèles est très préoccupante, car il s'agit de l'unité fonctionnelle fondamentale de l'hérédité et de la première source de variation de l'aspect, des caractéristiques et du comportement des plantes.

La principale cause actuelle de l'appauvrissement de la diversité génétique a été l'extension de l'agriculture commerciale moderne. La conséquence en grande partie involontaire de l'introduction de nouvelles variétés de plantes cultivées a été que les variétés traditionnelles ont été perdues. Les rapports sur les pays de la FAO (1996) confirment presque tous que l'érosion génétique s'installe et reconnaissent qu'il s'agit là d'un problème sérieux.

Un effort accru de recherche est nécessaire sur le potentiel des productions végétales génétiquement hétérogènes, qu'il s'agisse du niveau de diversité intra-spécifique (variétés locales, mélanges, lignées multiples) ou de diversité interspécifique (cultures multiples et cultures intercalaires) en particulier pour les zones marginales.

Des systèmes de production diversifiés sont menacés et avec eux les savoirs locaux qui les accompagnent ainsi que la culture et les compétences des producteurs d'aliments. Les savoirs locaux représentent l'ensemble des connaissances que les personnes d'une communauté donnée ont développé dans le temps et continuent à développer. Ils sont fondés sur l'expérience, souvent testés au cours de siècles d'utilisation, adaptés à la culture et à l'environnement local, gravés dans les pratiques de la communauté, dynamiques et en évolution permanente.

La culture et les savoirs locaux peuvent être considérés comme faisant partie intégrante de la biodiversité agricole, en tant que pratiques agricoles issues de la main de l'homme qui modèlent et conservent cette biodiversité. Les systèmes de savoirs sont dynamiques, les gens s'adaptent aux changements dans leur environnement, absorbent et assimilent des idées provenant de sources diverses. Cependant, le savoir et l'accès au savoir ne sont pas distribués de façons homogènes au sein d'une communauté ou parmi les communautés. Les agro écosystèmes traditionnels sont aussi génétiquement diversifiés, contenant des populations de variétés créoles (*landraces*) adaptées, lesquelles évoluent, face aux maladies et aux ravageurs.

Au fur et à mesure de l'avancée de la recherche, beaucoup de pratiques agricoles des paysans traditionnels qui dans le temps ont été considérées comme mauvaises ou primitives sont maintenant reconnues comme des pratiques sophistiquées et adéquates. Confrontés aux problèmes spécifiques de pente, d'inondation, de sécheresse, de ravageurs, de maladies, de basse fertilité de sols, etc., les petits paysans de part le monde ont développé des systèmes originaux de management destinés à affronter ces problèmes. De nombreux agriculteurs pauvres des pays en développement, en particulier ceux des zones marginales, plantent des cultures hétérogènes du point de vue génétique, pour limiter les risques de mauvaises récoltes.

### 4.3 Mesure de la diversité génétique et de la structure génétique

La diversité génétique constitue la matière première du sélectionneur, on peut l'estimer grâce à plusieurs paramètres standards à deux niveaux : intra-population et inter-population.

La diversité et la structure génétique des espèces végétales varient en fonction de leur système de reproduction, cycle de vie, distribution géographique, statut taxonomique (Hamrick and Godt, 1997) et de l'importance de la réserve en graines dans le sol (Falinska, 1999).

La transmission des différents allèles et leurs fréquences dans une population est très difficile à prévoir. Outre la difficulté à identifier une population, c'est à dire les limites du groupe d'individus sur lequel calculer les fréquences alléliques, de très nombreux facteurs peuvent modifier la fréquence de ces allèles (mutations, migrations, différence de survie ou fécondité entre individus). De plus, il faut considérer la transmission simultanée de très nombreux gènes polymorphes qui peuvent interagir entre eux et ne sont donc pas indépendants.

Une première étape pour contourner ces difficultés est d'aborder la transmission des caractères dans un cas simple appelé population théorique idéale, qui se définit par les caractéristiques suivantes :

- Population d'organismes diploïdes à reproduction sexuée et à générations non chevauchantes (aucun croisement entre individus de générations différentes).
- Population d'effectif infini où les croisements sont entièrement aléatoires.
- Population close génétiquement (absence de flux migratoires).
- Tous les individus, quel que soit leur génotype, ont la même capacité à se reproduire et à engendrer une descendance viable = absence de sélection.
- Absence de mutation et de distorsion de ségrégation méiotique (un individu Aa produira toujours 50% de gamètes A et 50% de gamètes a).

Parmi toutes ces caractéristiques, le croisement au hasard des individus, appelé système de reproduction panmictique, est l'hypothèse la plus importante. Cette hypothèse suppose que les individus ne choisissent pas leur partenaire sexuel ni en fonction de leur génotype, ni en fonction de leur phénotype (panmixie) et que la rencontre des gamètes se fait au hasard (pangamie).

### 4.3.1 Equilibre de Hardy –Weinberg

En génétique des populations, le principe de Hardy-Weinberg (**EHW**), établit que la composition génétique d'une population reste en équilibre sous certaines conditions : après une génération de croisement au hasard, les fréquences des génotypes d'un locus individuel atteignent une valeur d'équilibre particulier. Il spécifie aussi que ces fréquences d'équilibre peuvent être représentées comme une fonction simple des fréquences alléliques à ce locus.

Dans le cas le plus simple, avec un locus avec deux allèles (A) et (a) de fréquences alléliques (**p**) et (**q**) respectivement, la loi **EHW** prédit que la fréquence génotypique pour l'homozygote AA est  $p^2$ , celle de l'hétérozygote (Aa) est de  $2pq$  et celle de l'homozygote (aa) est ( $q^2$ ).

Le principe de Hardy-Weinberg est un principe de base de la génétique de populations. Les suppositions originales de l'équilibre étaient que l'organisme en considération soit diploïde, qu'il existe un croisement aléatoire dans la population, que la taille de la population soit assez grande pour diminuer l'effet de la dérive génétique et qu'il ne subit pas de sélection, mutation, migration (flux de gènes).

Quand les hypothèses du principe de Hardy-Weinberg ne sont pas réunies, ceci peut causer une déviation significative, c'est à dire que les fréquences génotypiques observées seront différentes des attendus théoriques.

### 4.3.2 Diversité génétique intra population

Par la suite, nous décrirons les paramètres intra-populations couramment utilisés dans ce type d'analyses.

#### 4.3.2.1 Les fréquences alléliques et génotypiques (**p<sub>i</sub>**)

La fréquence allélique est le paramètre de base caractérisant une population, elle est d'une grande importance dans le processus d'évolution (Hamrick, 1997), puisque les changements génétiques d'une population sont habituellement décrits par des changements des fréquences alléliques

Si l'on dénombre  $n_i$  copies du  $i^{ème}$  allèle dans un échantillon, la fréquence estimée  $\sim p_i$  de cet allèle est:

$$\sim p_i = \frac{n_i}{2n}$$

où  $n$  est le nombre d'individus de l'échantillon. Pour un locus dialélique en équilibre de Hardy-Weinberg (**EHW**)

La fréquence génotypique est également un paramètre de base pour caractériser la diversité génétique d'une population. En considérant un locus dialélique comportant un allèle A de fréquence  $p$  et un allèle a de fréquence

$q$ , dans une population Si  $p=f(A)$  et  $q=f(a)$ , alors selon la loi de **EHW** les fréquences génotypiques attendus sont :

$$f(AA)=p^2$$

$$f(aa)=q^2$$

$$f(Aa)=2pq$$

#### 4.3.2.2 L'hétérozygotie

Les indices d'hétérozygotie représentent la proportion d'hétérozygotes au sein de sous populations ou de la population totale. L'indice  $H_e$  représente l'hétérozygotie attendue pour une population en panmixie, c'est la probabilité que 2 individus choisis (4 allèles, 2 copies des gènes de deux individus) aléatoirement dans une population aient des allèles différents d'un locus donné. Il est estimé à partir des fréquences alléliques ( $2pq$ ) (Nei, 1973).

$$H_e = 1 - \sum (p_i)^2$$

$p_i$  est la fréquence au  $i^{ème}$  allèle pour un locus donné

L'indice  $H_o$  représente l'hétérozygotie observée, il est mesuré à partir des analyses génotypiques. En comparant ces deux indices il est possible de déduire l'impact des forces évolutives dans les populations, dues à l'autofécondation ou à l'autogamie.

L'indice de polymorphisme des loci **PIC** (Polymorphic Information Content) renseigne sur le polymorphisme des marqueurs. Le **PIC** se rapporte à la valeur d'un marqueur pour détecter le polymorphisme dans une population. Le **PIC** dépend du nombre d'allèles discernables et de la distribution de leur fréquence. Les valeurs de **PIC** vont de 0 (monomorphe) à 1 (hautement discriminant). Pour le calculer, on a utilisé la formule décrite par Bolstein et al. (1980) :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - 2 \left[ \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i^2 p_j^2 \right]$$

où  $p_i$  est la fréquence de l'allèle  $i$ , et  $n$  est le nombre des différents allèles dans l'échantillon.

#### 4.3.2.3 Le pourcentage de locus polymorphes ( $P$ )

Il s'agit du nombre de locus polymorphes par rapport au nombre total de locus étudiés. Une population est dite polymorphe à un locus si la fréquence de l'allèle le plus commun à ce locus est inférieure à un seuil arbitrairement choisi, généralement 0,99 ou 0,95, ce seuil est le plus souvent en relation avec la taille de l'échantillon. Ainsi pour une population dont la taille est supérieure ou égale à 100, le seuil de 0,99 peut être utilisé.

L'utilité de ce paramètre dépend du nombre de loci analysés.  $P$  n'est pas informatif lorsque peu de loci sont analysés (Berg and Hamrick 1997). Aussi  $P$  est en fonction de la taille de l'échantillon analysé, les allèles aux faibles fréquences pouvant être facilement observées dans des échantillons de grande taille. De ce fait, ce paramètre c'est pas un bon indicateur de la variabilité allélique (Nei, 1987).

#### 4.3.2.4 Le nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ) et le nombre efficace d'allèles ( $N_e$ )

Une autre mesure de la variabilité est la moyenne du nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ) :

$N_a$  = nombre total d'allèles / nombre de loci

D'autre part, pour déterminer la fréquence de ces allèles, pour un locus et un taux d'hétérozygotie donnés, on définit le nombre d'allèles efficaces ( $N_e$ ), maintenus dans une population d'effectif  $N$ , comme le nombre théorique d'allèles possibles dans une population de même taille et de même hétérozygotie à l'état stationnaire, mais dans laquelle tous ces allèles auraient la même fréquence (Kimura et Crow, 1964). On remarque que le nombre efficace d'allèles est plus faible que le nombre réel (sauf dans le cas où ceux-ci ont des fréquences alléliques égales).

Pour un locus  $i$  à  $k$  allèles  $A_1, A_2, \dots, A_k$  de fréquences  $p_1, p_2, \dots, p_k$ , le nombre efficace d'allèles est :

$$N_e = 1 / (p_1^2 + p_2^2 + \dots + p_k^2) = 1 / \sum p^2$$

$H_e$  = taux d'hétérozygotie ( $H_e$ ) ou le nombre efficace d'allèles ( $N_e$ ).

$$N_e = 1 / 1 - H_e$$

La diversité est maximale si les fréquences des différentes formes alléliques sont égales. Dans ce cas, le nombre efficace d'allèles ( $N_e$ ) est égal au nombre réel d'allèles. Dans une situation de consanguinité, les fréquences vont se déséquilibrer, un allèle étant favorisé par le hasard au détriment des autres. Le nombre efficace d'allèles sera alors inférieur au nombre réel.

#### 4.3.2.5 L'indice de diversité de Shannon

Ce paramètre renseigne sur la diversité génétique des populations, plus il est grand, moins les populations sont homogènes.

L'indice de Shannon est un indice d'abondance basé sur la diversité spécifique qui permet de décrire, avec d'autres la structure d'une population.

$$I = - \sum_{i=1}^s (p_i * \log_2 p_i)$$



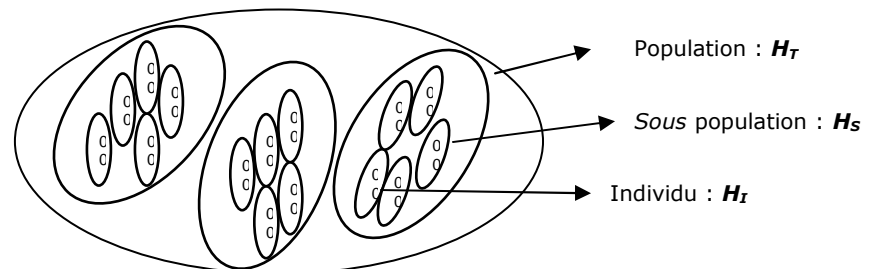
### 4.3.3 Diversité génétique inter-population

L'étude de la diversité génétique d'une population à travers ses subdivisions qui représentent les sous populations (à distribution spatiale continue ou discontinue) peut être faite soit par l'analyse des indices de fixation statistiques de Wright (1951), soit par l'analyse des indices de diversité de Nei (1973) (Quedraogo, 2003). Par la suite, nous décrirons ces paramètres de diversité génétique inter-populations couramment utilisés.

#### 4.3.3.1 *F*-statistiques de Wright

Wright (1951) a proposé les statistique ***F*** pour caractériser la structure génétique d'une population à travers ses sous populations. Il a défini ces paramètres pour un locus diallélique en termes de corrélation entre les gamètes s'unissant chez un individu. Les ***F*-statistiques** sont fondamentalement des estimations de la fixation des allèles à travers différents niveaux d'organisation d'une population. Les ***F*-statistiques** sont estimées à partir des composantes de la variance obtenue d'une analyse hiérarchisée (ANOVA) des fréquences géniques (Weir, 1996). Les indices de fixation de Wright : Le coefficient de consanguinité (***F<sub>IS</sub>***), la déviation des fréquences génotypiques (***F<sub>IT</sub>***), et l'indice de fixation (***F<sub>ST</sub>***) ; sont couramment utilisés pour la différenciation entre populations. Ces trois paramètres sont reliés par la relation suivante :

$$(1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) = (1 - F_{IT})$$



**Figure 7 :** Représentation graphique de la hétérozygotie moyenne à chaque niveau hiérarchique.

**Le coefficient de consanguinité (***F<sub>IS</sub>***)**, mesure la consanguinité des individus, consécutive à l'absence de panmixie à l'intérieur des sous populations. Ainsi une proportion importante d'homozygotes dans une sous population se traduit par un ***F<sub>IS</sub>*** élevé, par rapport à une population en ***EHW***.

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$$

Les principales explications des ***F<sub>IS</sub>*** significatifs (***F<sub>IS</sub>*** > 0) s'articulent autour de trois points (David, 1996) :

- effets populationnels : les individus considérés ne proviennent pas d'un pool unique de gamètes fécondés au hasard. Il est alors possible de considérer une réassociation non aléatoire des gamètes (consanguinité) ou bien il existe un mélange de groupes différenciés à l'intérieur de l'échantillon (effet Wahlund).

- non-détection du polymorphisme introduisant une sous-estimation de l'hétérozygotie observée. On distingue différentes possibilités de non-détection : l'existence d'allèles nuls (non visualisés) ou même artefacts de lecture.

**L'indice de fixation. ( $F_{ST}$ )** traduit le déficit en hétérozygotes dû à la subdivision de la population en sous populations et mesure le niveau de différenciation génétique entre les sous populations. Ce déficit en hétérozygotes est souvent attribué à la dérive génétique et/ou à un flux de gènes limités.

$$F_{ST} = \frac{(H_T - H_S)}{H_T}$$

$$F_{ST} = 1 - H_S / H_T$$

$H_S$ : hétérozygotie moyenne attendue au niveau sous population

$H_T$ : hétérozygotie moyenne attendue au niveau population totale

Cet indice mesure la réduction relative des hétérozygotes, lié aux différences alléliques entre sous populations. C'est un indice de diversification des populations. Si les sous populations sont identiques,  $F_{ST}=0$

$F_{ST}$ : de 0 à 0,05 : faible,

de 0,05 à 0,15 modérée,

de 0,15 à 0,25 importante et au delà, très importante.

**La déviation des fréquences génotypiques ( $F_{IT}$ )** mesure la déviation génotypique par rapport à l'Equilibre de **HW** sur l'ensemble de toutes les sous populations.

Les  $F$ -statistiques de Wright permettent ainsi de connaître la structure génétique d'une espèce grâce à l'estimation de la fixation des allèles dans l'ensemble des populations ( $F_{IT}$ ) et à l'intérieur des sous-populations ( $F_{IS}$ ) et aussi grâce à la différenciation génétique entre les sous-populations ( $F_{ST}$ ).

#### 4.3.3.2 Indices de diversité de Nei

Pour les locus multialléliques, Nei propose les indices de diversité : La **diversité génétique totale ( $H_T$ )** mesure la diversité génique de l'ensemble des populations. Celle-ci est la somme de la **diversité génique intra population ( $H_S$ )** et la **diversité inter population ( $D_{ST}$ )** (Crossa et al., 1993). La **diversité génétique intra population ( $H_S$ )** mesure la diversité génique à l'intérieur des sous populations. La **diversité génétique inter**

**population ( $D_{ST}$ )** mesure la diversité génétique entre les sous populations. Le coefficient de **différenciation génique ( $G_{ST}$ )** estime la différenciation entre les sous populations (Nei, 1973).

$$G_{ST} = 1 - H_S / H_T = D_{ST} / H_T$$

#### 4.3.3.3 Flux génique

Le flux de gènes indique les échanges unidirectionnels ou bidirectionnels de gènes par migration entre les populations. Le flux de gènes ( $N_m$ ) joue un rôle important dans la différenciation des populations (Zhao, 2006). Le flux des gènes est le mouvement des gènes entre différents pools génétiques (Slatkin, 1985) ayant comme résultat final l'homogénéisation des fréquences alléliques entre les populations.

L'estimation de ce paramètre peut se faire indirectement à l'aide de l'indice de fixation ( $F_{ST}$ ) de Wright selon le modèle de îles infinies. Ce modèle suppose un équilibre entre les effets homogénéisants du flux de gènes et les effets de différenciation de la dérive génétique. Ce modèle implique comme condition que la taille de la population et le taux de migration soient constants dans l'espace et le temps. Ainsi, il en résulte l'équation suivante :

$$F_{ST} = 1 / (1 + 4 N_m)$$

$$N_m = \frac{1}{4} (1 / F_{ST} - 1)$$

Où  $N$  est la taille efficace de la population,  $m$  le taux de migration et  $N_m$  le nombre de migrants. Sur les hypothèses d'absence de sélection et une situation d'équilibre entre la dérive génétique et le flux de gènes, la différenciation génétique entre les populations est inversement liée au flux de gènes qui existe entre elles.

#### 4.3.3.4 Distance génétique entre sous populations

Une autre approche de l'étude de la différenciation génétique entre des individus ou des populations est l'analyse du degré de similitude entre eux ou entre elles. Il est généralement considéré que la distance génétique entre les sous populations augmente en fonction du temps de leur divergence à partir de la population d'origine (Gonzales-Candelas et Palacios, 1995). Plusieurs estimateurs de la distance génétique sont proposés pour les fréquences alléliques (Nei, 1972; 1987 ; Reynolds *et al.*, 1983) mais le plus utilisé en génétique et en phylogénie est la distance génétique de Nei (1972).

Dans le cas où plus de deux populations sont analysées et que toutes les paires possibles de distances sont estimées, une matrice de distances peut être construite. À partir de cette matrice de distances, des analyses multi variées peuvent être effectuées : Soit pour faire une classification, dans ce cas, les groupements sont représentés par un dendrogramme ; soit pour faire de la phylogénie qui est alors représentée graphiquement par un arbre phylétique.

Le dendrogramme est un arbre exprimant les liens entre taxons sous la forme d'une succession de branchements. Il ne désigne rien d'autre qu'un arbre dont les éléments terminaux sont les taxons ou unités taxonomiques. Par contre un arbre phylogénétique est un arbre qui montre les relations de parenté entre des entités supposées avoir un ancêtre commun. Chacun des noeuds de l'arbre représente l'ancêtre commun de ses descendants. L'arbre peut être enraciné ou pas, selon qu'on est parvenu à identifier l'ancêtre commun à toutes les feuilles.

Ces approches sont souvent combinées avec des techniques de ré-échantillonnage numérique qui les rendent robustes (Sokal et Rohlf ,1995; Manly, 1997).

#### **4.4 Facteurs qui influencent la structure des populations**

Parmi les facteurs qui influencent la structure des populations on retrouve les suivants:

##### **4.4.1 Le système de reproduction**

Le système de reproduction est l'un des plus importants facteurs déterminant la structure génétique des populations (Hamrick, 1982) et leur aptitude à subir des changements adaptatifs. Différentes structures de la diversité peuvent être générées en fonction du type de reproduction. Ainsi, les plantes principalement autogames peuvent avoir une faible variabilité génétique intra-population et une forte variabilité inter-population. De la même façon, les plantes qui se reproduisent par voie asexuée présentent une plus grande variabilité inter-population. Par contre, pour les plantes qui sont essentiellement allogames, on peut observer jusqu'à 90% de la variabilité au niveau intra-population (Hamrick et Godt, 1997).

Le taux de pollinisation croisé peut être influencé par des facteurs de type génétique et environnementaux. Parmi les facteurs environnementaux, on distingue: la quantité de pollinisateurs, la densité des plantes reproductives, les décalages phénologiques entre les reproducteurs et les facteurs qui induisent une survie différentielle entre les zygotes issus de la pollinisation croisée et ceux qui sont issus d'autofécondation (Doligez, 1996).

Le *pigeonpea*, objet de notre étude est une plante autogame mais il peut présenter jusqu'à 20% de pollinisation croisée selon l'environnement et la présence des insectes pollinisateurs (Saxena *et al.*, 1990)

##### **4.4.2 La taille des populations**

Dans la nature, les individus d'une même espèce ne forment généralement pas une seule population, mais se dispersent (ou sont dispersés) et se répartissent en plusieurs populations. Chacune de ces populations évolue dans des conditions qui lui sont propres et peut acquérir une certaine originalité génétique et/ou démographique caractérisée par des

fréquences alléliques et une taille (nombre d'individus) plus ou moins différentes de celles des populations voisines. Par ailleurs, du fait qu'elles subissent diverses forces évolutives (sélection, mutation, dérive génétique) la plupart des populations naturelles ne suivent pas la loi de Hardy-Weinberg.

La relation existant entre la taille de la population et la variabilité génétique a été étudiée chez plusieurs espèces végétales. Les résultats de ces travaux sont controversés. Chez *Silene regia* par exemple; le type de corrélation reliant la taille des populations à la variabilité génétique varie en fonction de la région prospectée (Dolan, 1994). Les études réalisées sur des populations expérimentales de *Lolium multiflorum* ont montré que la diminution de la taille des populations entraîne une importante chute de la variabilité génétique (Polans et Allard, 1989). En revanche, chez *Gentiana pneumonanthe*, cette corrélation dépend du paramètre génétique considéré (Raijmann et al., 1994) alors qu'aucune corrélation n'a été mise en évidence chez *Senecio integrifolius* (Widen, 1993).

Cependant, d'une façon générale les petites populations ont tendance à perdre de la variabilité génétique au fil du temps. En effet, toute population de taille finie est soumise à la dérive génétique dont l'effet est particulièrement accentué dans les petites populations (Falconer, 1989). Cette perte de la variabilité génétique peut réduire le potentiel adaptatif ou les changements évolutifs, ce qui accroît la probabilité d'extinction des populations (Hedrick et Miller, 1992).

## INTRODUCTION

Notre étude se centre dans la région nord et spécifiquement dans le département de Lambayeque où les caractéristiques de salinité et de pauvreté des sols sont plus marquées. C'est là que le *pigeonpea* s'avère le plus compétitif grâce à ses qualités adaptatives à ces types de sols, son intégration aisée dans les systèmes de rotation et sa culture facile. Le manque d'eau caractéristique de cette région ne constitue pas un problème vu que le *pigeonpea* est très résistant à la sécheresse, il constitue une culture très compétitive face aux autres cultures plus exigeantes en intrants et en eau.

De toutes les cultures du département de *Lambayeque*, le *pigeonpea* est la plus appréciée. Il est connu pour être la plus rustique des cultures vivrières. Il n'a pas besoin de fertilisants, de pesticides, et il est résistant aux insectes. Il n'est pas exigeant en approvisionnement en eau et il s'adapte bien à des conditions arides. Il est également apprécié pour la consommation du grain vert et pour son haut contenu nutritif. Sa forte résistance aux parasites et sa capacité à survivre dans des conditions sauvages (en plus de se reproduire par voie naturelle) le démontrent. Deux types de culture se font à la fois à *Lambayeque* : la culture de "*landraces*" traditionnelles de moyenne et de longue durée (5-11 mois) dans des sols marginaux et également, le *pigeonpea* de monoculture commerciale de type annuel. Récemment, une variété de *pigeonpea* de courte durée (3-4 mois), la variété Prompex 2000 a été développée.

Dernièrement la demande est en augmentation grâce à la présence des industries de transformation de la graine. Toutefois, le manque de recherche, l'absence de techniques de caractérisation variétale, de conservation et d'utilisation du germoplasme constituent les principales contraintes empêchant l'augmentation de la surface cultivée et de la productivité du *pigeonpea*.

Le *pigeonpea* était jusqu'il y a quelques années une culture marginale. Petit à petit, elle a pris de l'importance en surface cultivée, et aussi en volume exporté. L'intérêt de faire l'état de la variabilité génétique s'avère aussi important. En effet, si la variabilité génétique est la matière première du sélectionneur, on ne peut la conserver efficacement qu'après une connaissance claire de celle-ci. Non seulement cette connaissance permet une conservation efficace; mais en plus, elle révèle la diversité disponible des formes préservées in situ dans des conditions désertiques de cette partie du territoire péruvien qui est atypiques par rapport à d'autres régions dans le globe. Précisément il s'agit d'une culture irriguée en climat aride.

Cette étude a permis d'unir les efforts de divers institutions péruviennes : universités (UNALM et UPRG), Ministère d'agriculture et instituts privés de recherche (IPEL) et sera le point de départ de l'établissement d'une banque de germoplasme de *pigeonpea* disponible pour les programmes d'amélioration et de production de nouvelles variétés de *pigeonpea* dont la surface cultivée pourrait s'étendre à des régions plus sèches, dans des sols présentant des problèmes de salinité, caractéristique de la cote péruvienne.

Cette premier chapitre intitulé : "Prospection et collecte" décrit comment les *landraces* péruviennes ont été collectées de façon à représenter le maximum de variabilité chez le *pigeonpea* à *Lambayeque* au Nord du Pérou.

## OBJECTIF

L'objectif de cette partie de notre travail était de réaliser la prospection et la collecte de *landraces* ou variétés traditionnelles du *pigeonpea* à *Lambayeque* au nord du Pérou en vue d'en étudier la variabilité agro-morphologique et génétique.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. *Matériel*

Le matériel végétal correspond aux *landraces* (génotypes locaux adaptés) du *pigeonpea*. Ces *landraces* se trouvent sur les champs des agriculteurs où la variabilité de l'espèce se traduit par des caractéristiques morphologiques diverses.

### 2. *Méthodes*

La prospection a pour but d'explorer la plus grande superficie du département et de trouver la plus grande variabilité de *pigeonpea*.

La procédure suivie pour la prospection, la détermination des sites de la collecte et l'échantillonnage seront décrits par la suite.

#### 2.1 *Prospection et collecte*

La prospection a été réalisée avec la collaboration de l'équipe de recherche de l'Institut péruvien de légumineuses (IPEL) et des chercheurs de l'Université Pedro Ruiz Gallo de *Lambayeque*. La synergie avec les spécialistes de la zone dans l'élaboration du parcours et la situation exacte des parcelles où il existe des plantations de *landraces* de *pigeonpea* nous ont permis de gagner du temps dans les déplacements.

##### 2.1.1 *Stratégie de prospection*

La prospection et le choix des sites ont suivi le parcours logique à partir du noyau génétique de l'espèce pour le département de Piura (nord de *Lambayeque*) qui se trouve à *Morropon* (Verschueren, 1992) jusqu'aux zones cultivées du département de *Lambayeque* (**figure 8**).

Ce parcours suit l'ancienne route entre Piura et *Lambayeque*, écartant l'autre possibilité de parcours, qui implique de traverser le désert de *Sechura* qui fait 150 km du nord au sud et 100Km d'ouest à est.

Dans le parcours suivi, tous les secteurs (par rapport à la distribution de l'eau), ont également été pris en compte afin de couvrir une surface la plus diversifiée.

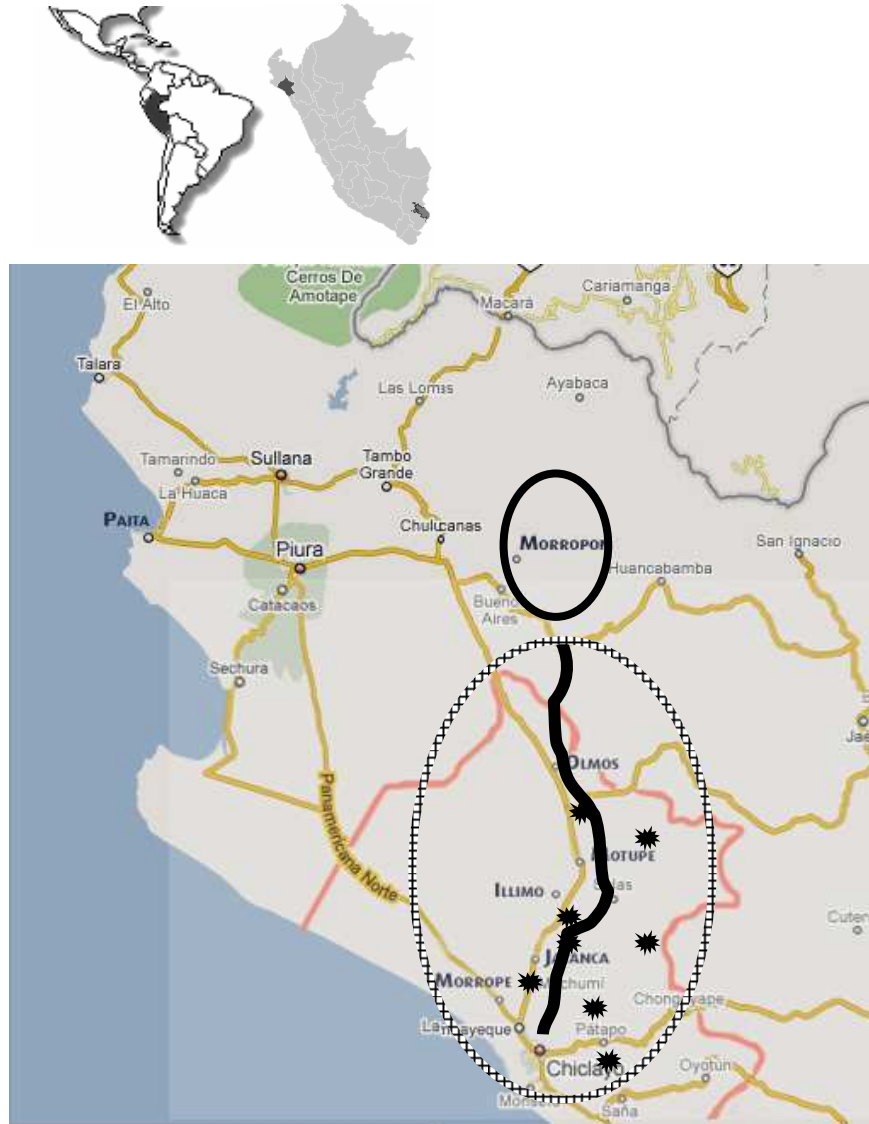
##### 2.1.2 *Détermination des sites de collecte*

Le parcours a été planifié avec les spécialistes de l'Institut de légumineuses de graine et du Ministère de l'agriculture qui ont formé l'équipe de collecte. La collecte a été réalisée pendant une semaine (12/12/05 au 16/12/05).



Chaque secteur a été prospecté pour identifier les parcelles (petites exploitations) où il existait des plantations anciennes de *pigeonpea* et où il n'existait pas de variétés commerciales dans les alentours. Ces plantations se trouvaient dans des jardins potagers de petites exploitations.

Chaque parcelle était isolée par des barrières physiques, ou d'autres cultures de façon à représenter les différentes conditions de sols, conditions hydriques, salinité etc. Une fiche de récolte a été remplie pour chaque échantillon collecté.



**Figure 8 :** Zone de prospection Lambayeque - Pérou. Parcours à partir du noyau génétique de l'espèce à Morropon (Verschueren, 1992) jusqu'aux zones cultivées du département de Lambayeque.

### 2.1.3 Échantillonnage

Lors de l'échantillonnage, l'identification des plantes a été faite pendant la récolte de grains secs. Les plantes ont été identifiées individuellement et les caractéristiques de gousse et de grain, comme la couleur et la forme des gousses ont été prises en compte. Les caractères comme la couleur primaire et secondaire de la gousse et de la graine ainsi que la forme de la gousse sont ceux de plus haute héritabilité (Verschueren, 1992). Les individus ont été choisis de façon à échantillonner la plus grande variabilité observable de *pigeonpea*.

La totalité des gousses de chaque individu cible a été collectée dans un sac, on a identifié l'endroit de collecte de même que d'autres caractéristiques comme la taille de plante, le nombre de branches. Le comptage des gousses, le pesage des gousses et de graines tout comme l'évaluation de la forme de graine ont été réalisés au laboratoire. Au total nous avons analysé 2 individus par champ, 54 plantes en total.

Des plantes qui contenaient 35 gousses ou plus ont été retenues, soit 140 graines environ (si en moyenne chaque gousse contient 4 graines). Cette quantité minimum de graines est suffisante pour l'installation des essais prévus avec la disposition de Lattice 5x5 avec deux répétitions, dans deux environnements.

Une fiche de récolte a été remplie dans chaque parcelle récoltée. Chaque prélèvement est suivi d'un entretien avec le paysan conducteur de la parcelle. Les informations relatives aux noms du paysan, à la variété, à la localisation du village, à l'origine des semences, aux techniques culturales, aux attaques parasitaires et à la performance agronomique sont recueillies pour chaque échantillon. Ces informations de base ont été confrontées avec notre propre appréciation du matériel végétal visité.

En résumé, l'échantillonnage a compris 5 localités. La totalité des gousses d'une plante a été prélevée et 2 plantes ont été collectées par site ou au champ (54 plantes collectées). En laboratoire, seulement une plante/individu par site a été retenue. Chaque plante récoltée a constitué une famille maternelle qui a été évaluée agro morphologiquement dans le chapitre suivant.

## 2.2 Caractéristiques évaluées lors de la collecte

Le choix et l'évaluation des descripteurs ou caractéristiques par plante, ont été effectués en suivant le Manuel de Descripteurs de *pigeonpea* de l'IBPGR et le "*Estudio Morfológico y Taxonómico del Fríjol de palo para la Región Grau*" de Verschueren (1992). Au moment de la collecte les plantes se trouvaient à la période de maturité, donc l'utilisation des descripteurs a été limitée au période de maturité.

Au total 9 caractéristiques ont été évaluées: 3 caractéristiques quantitatives (**tableau 4**) ainsi que 6 caractéristiques qualitatives (**tableau 5**).

**Tableau 4** : Les caractéristiques quantitatives du matériel collecté.

Caractéristiques	sigle	Définition	Période d'observation	unités
<b>Plante</b>				
1 Hauteur de plante	HP	longueur depuis le col de la plante jusqu'à l'apex de la tige principale	récolte de grains secs	m
<b>Branches</b>				
2 Nombre de branches productives par plante	BP	somme totale de branches productives sur la tige principale	récolte de grains secs	unités
<b>Gousse</b>				
3 Nombre de gousses par plante	NGo/P	nombre total de gousses récoltées par plante	récolte de grains secs	unités

**Tableau 5** : Les caractéristiques qualitatives du matériel collecté.

Caractéristiques	sigle	Définition	Période d'observation	Catégories
<b>Gousse</b>				
1 Couleur de la gousse	CGo	coloration externe de la gousse	récolte de grains secs	beige beige rosé marron foncé rouge pourpre
2 Couleur secondaire de la gousse	CSGo	distribution de la pigmentation : totale, en taches ou des bandes roses foncées, mauves à griottes sur la surface ou dans les cavités de la gousse	récolte de grains secs	type a type b type c
3 Forme de la gousse	FGo	figure géométrique de la gousse et de ses cavités	récolte de grains secs	droite, courbe, "pecho", "mojarra", "pescado", "falcada"
<b>Grain</b>				
4 Forme du grain sec	FGo	figure géométrique du grain	récolte de grains secs	ellipse cylindrique réniforme
5 Couleur du grain sec	CGr	coloration externe du grain, beige ou crème	récolte de grains secs	crème beige clair beige rose
6 Couleur secondaire du grain	CSGr	distribution de pigmentation d'orange à mauve griotte sur la couleur externe du grain	récolte de grains secs	sans pigment, taches marron, points marron points mauve

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Zone de prospection

La culture du *pigeonpea* se concentre principalement dans la partie nord du pays dans les départements de *Piura* et *Lambayeque* principalement. *Lambayeque* se caractérise par des conditions de sécheresse intense. Dans ces zones, la culture de *pigeonpea* se révèle être une culture importante par rapport aux autres cultures principalement à cause de ses caractéristiques de rusticité et de son entretien facile. L'avantage est de pouvoir se comporter comme une culture pérenne et son potentiel agro-industriel la met en valeur.

La zone de prospection comprend la région où le *pigeonpea* est cultivé traditionnellement. Nous trouvons des *landraces* de cette espèce, principalement dans les jardins et dans les bordures des exploitations.

Les missions de collecte ont été effectuées de manière à rassembler un maximum de diversité génétique pour représenter les variétés traditionnelles adaptées aux différentes conditions de la cote nord du Pérou.

#### 1.1 Caractéristiques de la zone prospectée

La zone prospectée comprend le département de *Lambayeque* et plus précisément les localités de : *Illimo*, *Morrope*, *Jayanca*, *Motupe* et *Olmos*, qui son décrits par la suite dans le **tableau 6**.

La **figure 8 (page 51)** montre les localités où les échantillons ont été collectés. La zone de prospection couvre les latitudes 5 à 6 °S et les longitudes 79 à 80 °O.

Tableau 6 : Caractéristiques de zones prospectées au Pérou.

Localités	Situation	Altitude (m)	Limites	Relief	Surface (km <sup>2</sup> )	Hab.	(Hab/ km <sup>2</sup> )	Activités
<i>Morropo</i>	Situé à droit de la route Panaméricana à 33,5 km au nord de la ville de <i>Chiclayo</i> , au sud du désert de <i>Sechura</i> .	32	au nord : <i>Olmos</i> , à l'est : <i>Pacora</i> , <i>Ilimo</i> , <i>Tlacoma</i> et <i>Lambayeque</i> , au sud et à l'ouest : l'Océan Pacifique	Son relief est plat avec des dunes, ses sols sont très fertiles mais ils souffrent de sécheresse.	1.301,21	19.641	15	Sa principale activité est l'agriculture. C'est un des seules localités où on cultive encore le coton de couleur natif du pays ( <i>Gossypium barbadense</i> ).
<i>Ilimo</i>	Situé à gauche du fleuve <i>la Lacha</i> , à 37 km au nord du <i>Chiclayo</i> .	46	au nord : <i>Pacora</i> , à l'est : <i>Flippo</i> , au sud : <i>Tlacoma</i> , à l'ouest : <i>Pacora</i> et <i>Morropo</i> .	relief plat avec quelques montagnes et dunes	67.300	8.452	91	Sa principale activité est l'agriculture: du maïs blanc, jaune et des hybrides, du haricot et de la luzerne. On pratique l'élevage extensif et l'apiculture.
<i>Jayanca</i>	Situé sur l'ancienne route Panaméricana, à 47 km au nord de <i>Chiclayo</i> , loin de la mer et plus proche des Andes.	60	au nord : <i>Olmos</i> , <i>Morropo</i> et <i>Salas</i> , à l'est : <i>Acachuan</i> , au sud : <i>Flippo</i> et <i>Pacora</i> , à l'ouest : <i>Olmos</i> .	Son relief est plat avec quelques élévations	605.74	9853	16	Sa principale activité est l'agriculture: du coton, du maïs, du raisin, du <i>zarcadaja</i> , du <i>pisgoyoso</i> sous forme commerciale et des arbres fruitiers.
<i>Motupe</i>	Situé entre le fleuve <i>Motupe</i> et le fleuve <i>Chicama</i> à 78 km au nord du <i>Chiclayo</i> , loin de la mer et plus proche des Andes.	129	au nord et à l'ouest : <i>Olmos</i> , à l'est <i>Salas y Chiclayo</i> , au sud <i>Jayanca</i> et <i>Salas</i> .	Son relief est plat avec quelques élévations. Ses sols sont de grande qualité mais souffrent du manque d'eau.	605.74	9853	16	Sa principale activité est l'agriculture: du coton, du maïs et des arbres fruitiers.
<i>Olmos</i>	Situé à 108 km au nord du <i>Chiclayo</i> .	174	au nord et à l'ouest : <i>Pura</i> , à l'est <i>Salas</i> , <i>Motupe</i> , <i>Jayanca</i> et <i>Pacora</i> , au sud : <i>Morropo</i> .	Son relief est plat avec quelques élévations, et dunes.	3544	22709	4	Malgré le manque d'eau, sa principale activité est l'agriculture: du coton, du citron vert, des mangues et du maïs principalement.

## 2. Prospection et collecte

Les coordonnées des localités prospectées peuvent être observées dans le **tableau 07**. Dans chaque localité, chacun des secteurs (délimité par le système de distribution de l'eau) a été prospecté également. Au total 9 secteurs ont été prospectés.

Le **tableau 8** montre le nombre d'échantillons collectés et le nombre des géotypes retenus par localité et secteur.

**Tableau 7** : Les coordonnées des localités de collecte *Lambayeque*, Pérou.

Localité	Longitude E/O	Latitude N/S	Altitude (m)
<i>Morrope</i>	80°02'04,64" O	06°33'04,74" S	52
<i>Jayanca</i>	79°51'38,12" O	06°28'00,67" S	163
<i>Illimo</i>	79°49'53,48" O	06°25'12,05" S	187
<i>Motupe</i>	79°42'26,12" O	06°09'35,84" S	455
<i>Olmos</i>	79°44'29,37" O	05°59'04,00" S	597

**Tableau 8** : Nombre d'échantillons de *pigeonpea* collectés par localité et secteur à *Lambayeque*, Pérou.

Localité	Secteur	Échantillons collectés
<i>Illimo</i>	<i>Marceli</i>	8
<i>Morrope</i>	<i>Medianía</i>	6
	<i>Cruz de Médano</i>	2
	<i>Casa blanca</i>	4
	<i>Colorada</i>	4
<i>Jayanca</i>	<i>Santa Matilde</i>	12
<i>Motupe</i>	<i>Chitarra</i>	4
	<i>Mondragón</i>	6
<i>Olmos</i>	<i>Cruz Blanca</i>	8
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>54</b>

Des 54 échantillons collectés au total, seulement 22 ont été retenus (**figure 9**). Ceux qui ont eu suffisamment de grains pour installer l'essai dans deux localités (2 fois 96 grains et 10 grains qui ont été gardés dans la chambre froide pour des évaluations futures).

Le prélèvement de géotypes a été fait de façon à prendre en compte toute la variabilité existante. 2 individus par exploitation ont été collectés.



**Figure 9** : Prospection de la collecte du *pigeonpea*. Décembre 2005 Lambayeque – Pérou.

### 3. Représentativité de la zone prospectée

Selon les statistiques de l'OIA Ministère d'Agriculture (2005), la surface cultivée de *pigeonpea* est de 1.370 hectares dans le département de *Lambayeque*. Dans cette surface, on retrouve des variétés commerciales et des *landraces*. Les *landraces*, objet de notre récolte, ont été collectés dans des zones limitées à des jardins potagers ou des barrières naturelles au bord de cours d'eau.

Pour faire une estimation de la représentativité des échantillons collectés, nous avons élaboré le **tableau 9** avec les données de la surface totale et le nombre d'échantillons collectés et d'échantillons retenus. Les génotypes collectés au total ont été de 54 et les génotypes retenus de 22 pour les évaluations agro morphologiques en raison du coût de conduction des essais sur le terrain et principalement du nombre des génotypes qu'on s'est fixé comme limite (arrangement lattice 5x5, 25 accessions, 22 *landraces* plus 3 témoins).

La zone prospectée a couvert 5 localités, soit environ 1.015 hectares du total de surface cultivée du *pigeonpea* du département. On peut dire qu'en moyenne, on a collecté 1 échantillon par 19 hectares où la culture est

présente. Mais ces 19 hectares correspondent au *pigeonpea* de variétés cultivées et de *landraces*.

**Tableau 9** : Représentativité de la zone prospectée par localité sur base de l'échantillonnage des *landraces* du *pigeonpea* réalisée à *Lambayeque*, Pérou.

0

Localité	Surface total de <i>pigeonpea</i> Ha	Échantillons collectés	Relation : nombre d'hectares représentés par échantillon
<i>Motupe</i>	397	10	40
<i>Jayanca</i>	315	12	26
<i>Illimo</i>	115	8	14
<i>Olmos</i>	110	8	14
<i>Morrope</i>	78	16	5
<b>Total</b>	<b>1015 (*)</b>	<b>54</b>	<b>Moyenne =19</b>

(\*) Source OIA Ministère de l'agriculture du Pérou 2005. Surface total cultivée du *pigeonpea* à *Lambayeque*.

## 4. Génotypes collectés

Au total 54 génotypes ont été collectés pour finalement n'en retenir que 22. Dans cette partie, nous présenterons les 22 génotypes retenus à l'aide des descripteurs morphologiques qualitatifs (6) et quantitatifs (3) qu'on a pu mesurer sur le terrain à l'étape de maturité du grain sec.

Le choix de 22 génotypes a été fixé en fonction des limites de disponibilité de coût de l'expérimentation. La surface de celle-ci a été planifiée au départ pour être conduite dans un *lattice* 5x5, soit 25 accessions à évaluer (22 *landraces* plus 3 témoins).

Ces 22 génotypes retenus plus 3 témoins seront évalués postérieurement dans le Chapitre 2, où nous ferons la caractérisation des accessions, issues chacune d'un individu collecté, qui représente une famille maternelle.

### 4.1 Caractérisation des génotypes collectés

La caractérisation qualitative et quantitative des 22 génotypes collectés a été faite sur base de descripteurs repris dans les tableaux 4 et 5 (page 53). Les résultats de cette caractérisation ont été repris dans les tableaux 10 et 11.



**Tableau 10** : Caractérisation qualitative de 22 génotypes du *pigeonpea* collectés dans le département de *Lambayeque*, Pérou. Décembre 2005.

N°	Génotype	Secteur	Couleur de la gousse	Couleur secondaire de la gousse	Forme de la gousse	Forme du grain sec	Couleur du grain sec	Couleur secondaire de la graine
			CGo	CSGo	FGo	FGr	CGr	CSGr
1	Illimo 1	Marceli	beige	sans pigmentation	courbe	répiforme	beige	points marron
2	Illimo 2	Marceli	rouge pourpre	sans pigmentation	droite	circulaire	beige	points marron
3	Illimo 4	Marceli	beige	sans pigmentation	droite	circulaire	beige	points marron
4	Morrope 9	Mediana	beige	lignes rouges	courbe	circulaire	beige	points marron
5	Morrope 11	Mediana	beige	lignes rouges	courbe	répiforme	beige	points marron
6	Morrope 12	Mediana	beige	sans pigmentation	droite	circulaire	beige	taches marron
7	Morrope 22	Cruz del medano	beige	sans pigmentation	courbe	répiforme	beige	points marron
8	Jayanca 23	Santa Matilde	rose foncé	taches mauves	droite	circulaire	beige	points marron
9	Jayanca 24	Santa Matilde	rose foncé	sans pigmentation	droite	circulaire	beige	taches marron
10	Jayanca 26	Santa Matilde	rose foncé	lignes rouges	droite	circulaire	beige	taches marron
11	Morrope 28	Casa blanca	beige	sans pigmentation	droite	répiforme	beige	taches marron
12	Morrope 30	Casa blanca	rose foncé	lignes rouges	mojarra	circulaire	beige	points marron
13	Morrope 34	La colorada	beige	sans pigmentation	droite	répiforme	beige	sans pig
14	Morrope 37	La colorada	beige	taches mauves	courbe	répiforme	beige	points marron
15	Motupe 40	Chitarra	beige	lignes rouges	mojarra	circulaire	beige	taches marron
16	Motupe 44	Mondragon	beige	sans pigmentation	mojarra	circulaire	beige	points marron
17	Motupe 45	Mondragon	beige	sans pigmentation	droite	répiforme	crème	taches marron
18	Olmos 47	Cruz blanca	beige	sans pigmentation	droite	circulaire	beige	sans pig
19	Olmos 48	Cruz blanca	beige	sans pigmentation	courbe	répiforme	beige	taches marron
20	Olmos 49	Cruz blanca	beige	sans pigmentation	droite	circulaire	crème	sans pig
21	Olmos 52	Cruz blanca	beige	taches mauves	courbe	circulaire	beige	points marron
22	Olmos 54	Cruz blanca	beige	sans pigmentation	courbe	répiforme	beige	taches marron

**Tableau 11** : Caractérisation quantitative de 22 géotypes du *pigeonpea* collectés dans le département de *Lambayeque*, Pérou. Décembre 2005.

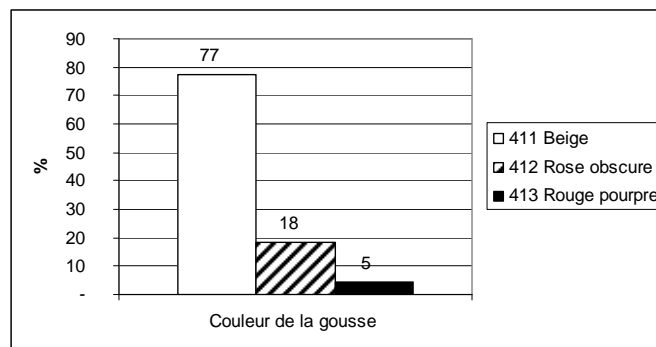
N °	Géotype	Secteur	Hauteur de plante (m)	Nombre de branches productives par plante	Nombre de gousses par plante
			HP	BPR	NGo/P
1	Illimo 1	Marceli	3,0	10	81
2	Illimo 2	Marceli	2,7	7	75
3	Illimo 4	Marceli	1,7	4	70
4	Morrope 9	Mediana	1,7	7	92
5	Morrope 11	Mediana	1,6	12	138
6	Morrope 12	Mediana	2,1	7	215
7	Morrope 22	Cruz del medano	2,3	12	89
8	Jayanca 23	Santa Matilde	1,0	6	75
9	Jayanca 24	Santa Matilde	1,8	11	138
10	Jayanca 26	Santa Matilde	0,6	6	70
11	Morrope 28	Casa blanca	2,7	12	82
12	Morrope 30	Casa blanca	2,6	13	85
13	Morrope 34	La colorada	2,8	10	80
14	Morrope 37	La colorada	2,3	5	142
15	Motupe 40	Chitarra	2,3	12	45
16	Motupe 44	Mondragon	3,0	12	98
17	Motupe 45	Mondragon	3,0	6	115
18	Olmos 47	Cruz blanca	4,0	4	94
19	Olmos 48	Cruz blanca	6,0	10	72
20	Olmos 49	Cruz blanca	5,0	10	105
21	Olmos 52	Cruz blanca	4,8	15	114
22	Olmos 54	Cruz blanca	2,5	15	58

## 4.2 Variabilité des génotypes collectés

### 4.2.1 Descripteurs qualitatifs

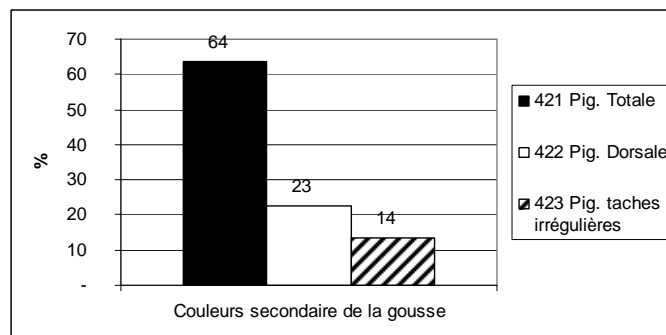
La variabilité observée pour chacun des 6 descripteurs qualitatifs évalués lors de la collecte est représentée graphiquement dans les **figures 10-A-B-C-D-E-F**.

On observe que 77% des génotypes collectés ont la gousse beige, 18% rose foncé et 5% rose pourpre. Pourtant la couleur beige prédomine sur la couleur rose foncé et sur la couleur pourpre dans les gosses des génotypes collectés (**figure 10-A**).



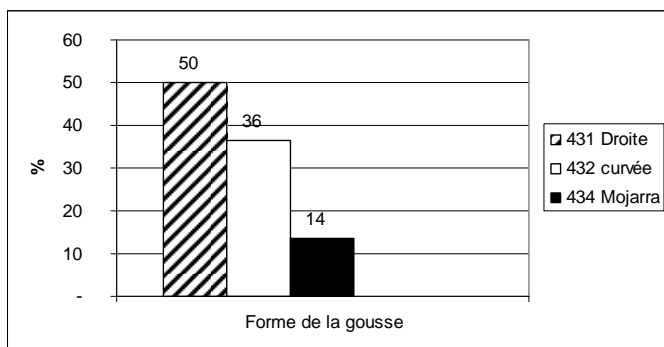
**Figure 10-A :**  
Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour la couleur de la gousse.

On observe également que la pigmentation totale de la gousse prédomine sur les autres formes de pigmentation secondaire. Ce qui est démontré par les 64% des génotypes collectés qui ont une pigmentation totale, 23% une pigmentation dorsale et 14% une pigmentation en taches irrégulières (**figure 10-B**).



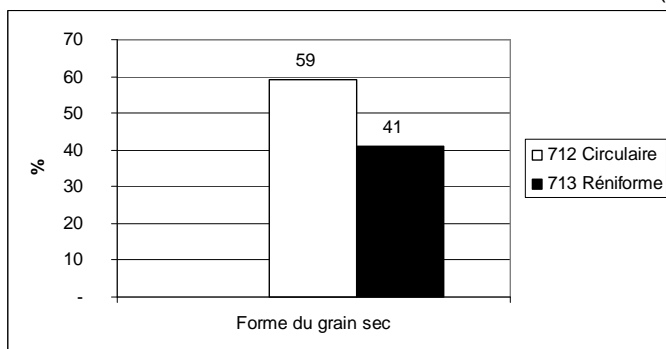
**Figure 10-B :**  
Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour la couleur secondaire de la gousse.

La plupart des génotypes collectés soit 50% ont la forme de la gousse droite; 36% ont la forme courbée et 14% ont le type *mojarra* (**figure 10-C**).



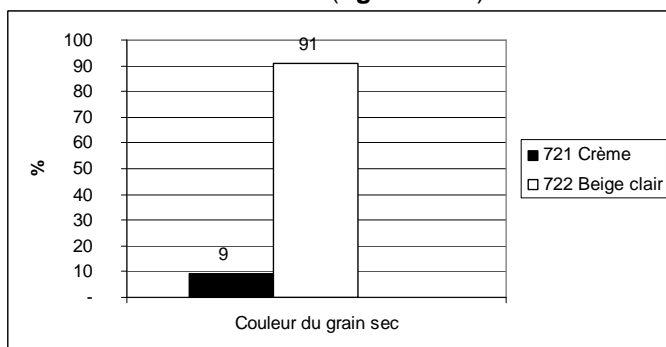
**Figure 10-C :**  
Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour la forme de la gousse.

Pour la forme de grain sec on peut affirmer que 59% des génotypes collectés ont la forme circulaire et 41% la forme de rein (**figure 10-D**).



**Figure 10-D :**  
Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour la forme du grain sec.

La plupart des génotypes soit 91% ont la couleur beige clair du grain sec et 9% la couleur crème (**figure 10-E**).

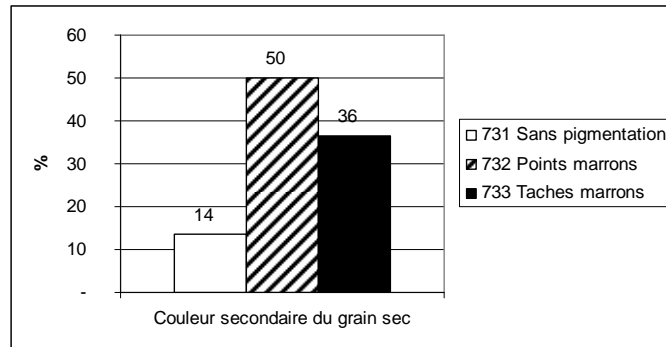


**Figure 10-E :**  
Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour la couleur du grain sec.

Pour la couleur secondaire du grain sec, 50% des génotypes collectés ont des points marron, 36% des taches marron et 14% n'ont pas de pigmentation secondaire (**figure 10-F**).

Cette variabilité observée au moment de la collecte pourrait s'expliquer par l'habitude des agriculteurs de conserver les grains successivement dans les champs, culture après culture et sans les sélectionner. D'ailleurs on peut remarquer que les paysans de cette zone ne sélectionnent pas les semences, ils préfèrent garder leur diversité. Cela

pourrait être lié aux traditions agricoles des peuples anciens (sur d'autres types de cultures).

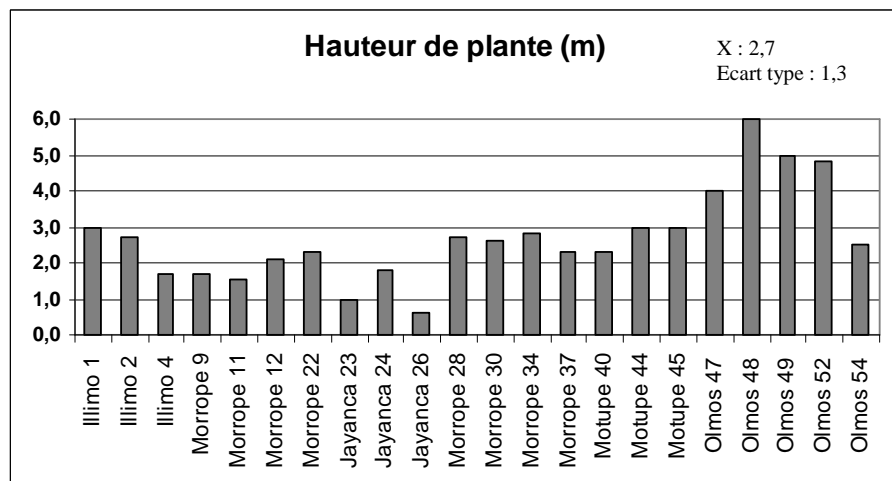


**Figure 10-F :** Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour la couleur secondaire du grain sec.

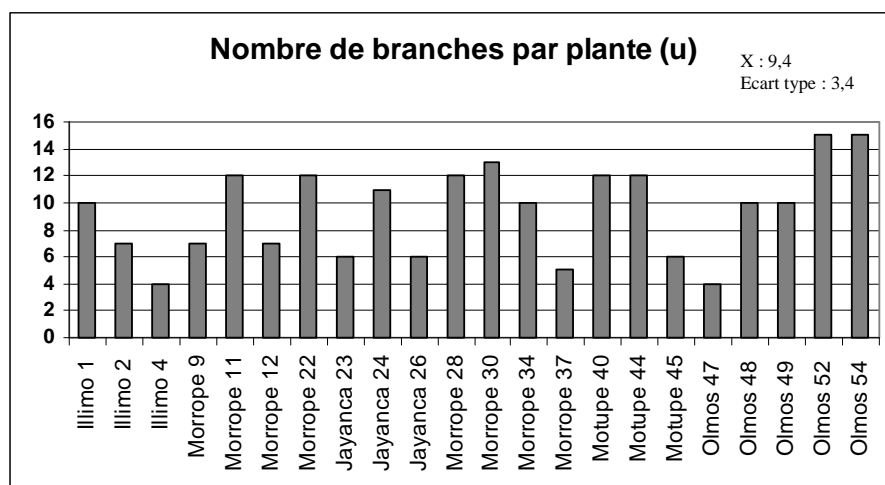
En raison de son autoconsommation, ils préfèrent les types de plante de large période végétative qui leur permettent d'avoir une récolte tout au long de l'année dont les types précoces ne sont pas conservés. Bien qu'il s'agisse d'une culture pérenne et qu'aucune sélection ne soit faite, ces deux facteurs font que la variabilité est conservée au cours du temps.

#### 4.2.2 Descripteurs quantitatifs

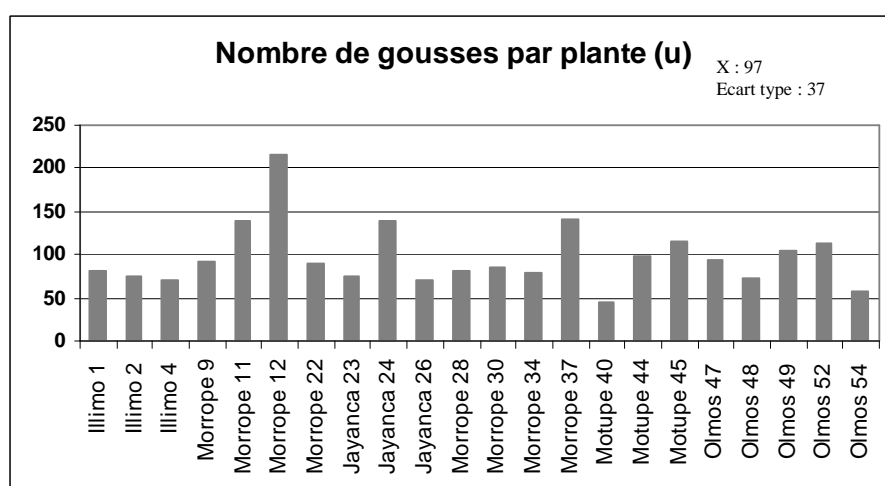
La variabilité observée pour chacun des 3 descripteurs quantitatifs (taille de plante, nombre de branches par plante et nombre de gousses par plante) mesurés lors de la collecte du *pigeonpea* est représentée graphiquement dans les **figures 11-A-B-C**.



**Figure 11-A :** Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour la hauteur de plante.



**Figure 11-B :** Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour le nombre de branches par plante.



**Figure 11-C :** Variabilité observée chez 54 génotypes collectés de *pigeonpea* pour le nombre de gousses par plante.

Une grande variabilité est observée pour les descripteurs quantitatifs. Ces descripteurs quantitatifs devront être évalués aux mêmes conditions environnementales pour mesurer réellement la variabilité génotypique des *landraces* collectés. Cette évaluation est décrite dans le Chapitre 2 où les populations (familles maternelles) issues de ces *landraces* sont évaluées lors d'un essai à *La Molina*, Pérou.

## 5. Conclusions

La prospection a été réalisée en suivant le parcours d'introduction supposé du *pigeonpea* dans le département de *Lambayeque* à partir du noyau génétique proposé par Verschueren en 1992 pour le département de Piura. Ce travail a permis de constater la variabilité phénotypique de *landraces* du *pigeonpea* maintenue dans les jardins potagers des petites exploitations, malgré l'accroissement de la culture du *pigeonpea* pour l'exportation.

Un total de 54 génotypes de *pigeonpea* ont été collectés et 22 génotypes ont été retenus pour la caractérisation phénotypique des populations formées. De la même façon, l'analyse de la diversité génétique à l'aide de marqueurs microsatellites sera vue dans les chapitres suivants.

Dans les génotypes collectés, on a observé que la couleur beige des gousses prédomine sur la couleur rose foncé et sur la couleur pourpre. De la même façon, la pigmentation totale de la gousse prédomine sur les autres formes de pigmentation secondaire. On a aussi observé que la plupart des génotypes collectés ont des gousses de forme droite et des grains secs de forme circulaire et de couleur beige clair.

La variabilité observée des descripteurs mesurés au moment de la collecte pourrait s'expliquer par l'habitude des agriculteurs de conserver les grains successivement dans les champs, culture après culture et par le comportement des paysans dans cette zone par rapport aux semences de ces cultures. Ils ne les sélectionnent pas, mais, ils préfèrent garder leur diversité. Ils préfèrent également les types de plante à large période végétative qui leur permettent d'avoir une récolte tout au long de l'année.

La collecte réalisée a permis d'enrichir la banque locale de germoplasme avec des *landraces* de *pigeonpea* et de mettre à disposition des chercheurs du pays la variabilité conservée dans ces *landraces*, soit pour leur caractérisation ou pour leur utilisation dans des programmes de recherche.

## INTRODUCTION

Il existe toujours de nombreux caractères pour lesquels des variations entre individus sont observées. Certaines de ces variations s'expriment au niveau phénotypique. Dans le processus de caractérisation phénotypique d'une collection, si l'objectif principal est de mesurer la variabilité du groupe, il est recommandable de sélectionner des caractéristiques ou descripteurs qui soient les plus discriminants possibles. Un descripteur végétal est une caractéristique identifiable et quantifiable d'une espèce. Les descripteurs morpho-agronomiques peuvent être qualitatifs ou quantitatifs, ils peuvent être importants du point de vue agronomique, de l'amélioration génétique, du marché ou du point de vue culinaire. Parfois on inclut aussi des descripteurs indicateurs des composantes de rendement avec l'objectif de donner au sélectionneur une indication du potentiel du rendement. Souvent ces descripteurs sont influencés par les changements environnementaux.

Dans notre étude nous utiliserons les descripteurs du *pigeonpea* publiés par l'International Board for Plant Genetic Resources – IBPGR (International Plant Genetic Resources Institute – IPGRI) et l'Institut international de recherche sur les cultures dans les zones tropicales semi-arides (ICRISAT) en 1993. Les caractères établis par Verschueren (1992) compléteront notre caractérisation.

## OBJECTIFS

L'objectif de ce chapitre a été de réaliser la caractérisation agro-morphologique de la collection du *pigeonpea* établie à la Molina <sup>(1)</sup>. Celle-ci se compose de 22 génotypes collectés à *Lambayeque* et de 3 témoins (deux variétés commerciales et une variété indienne).

<sup>(1)</sup> En collaboration avec l'Université Agraire La Molina, UNALM, Lima Pérou.



## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

25 accessions ont fait l'objet de cette étude (**tableau 12**):

- 22 de ces accessions ont été collectées à *Lambayeque*, dans le nord du Pérou, (Chapitre 1 : Prospection et collecte) pendant le mois de décembre 2005.
- 3 témoins : Le choix des témoins se porte sur deux variétés améliorées : ISO10 et Prompex2000 (**Figure 49 et 50, page 127**). Prompex2000 (obtenue de croisements multiples) et ISO10 (obtenue par sélection d'une variété locale) fournie par PROMENESTRAS-IPEL-Pérou (Institut de recherche au Pérou). Ces variétés sont très répandues dans des zones cultivées de *pigeonpea* au Pérou. Le troisième témoin est une variété indienne (ICPL 94008) de la banque de germoplasme de PLGO-UNALM).

**Tableau 12** : Identification des accessions de *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L) Millsp.) utilisées dans la caractérisation agro-morphologique à La Molina 2006.

	Accessions	Site de collecte	Date
1	Illimo 1	Marcelli	12/12/2005
2	Illimo 2	Marcelli	12/12/2005
3	Illimo 4	Marcelli	12/12/2005
4	Mórrope 9	Medianía	13/12/2005
5	Mórrope 11	Medianía	13/12/2005
6	Mórrope 12	Medianía	13/12/2005
7	Mórrope 22	Cruz del Médano	13/12/2005
8	Mórrope 28	Casa blanca	14/12/2005
9	Mórrope 30	Casa blanca	14/12/2005
10	Mórrope 34	La Colorada	15/12/2005
11	Mórrope 37	La Colorada	15/12/2005
12	Jayanca 23	Santa Matilde	13/12/2005
13	Jayanca 24	Santa Matilde	13/12/2005
14	Jayanca 26	Santa Matilde	13/12/2005
15	Motupe 40	Chitarra	16/12/2005
16	Motupe 44	Mondragón	16/12/2005
17	Motupe 45	Mondragón	16/12/2005
18	Olmos 47	Cruz blanca	16/12/2005
19	Olmos 48	Cruz blanca	16/12/2005
20	Olmos 49	Cruz blanca	16/12/2005
21	Olmos 52	Cruz blanca	16/12/2005
22	Olmos 54	Cruz blanca	16/12/2005
23	Iso 10	Vista Florida	16/12/2005
24	Pompex 2000	Vista Florida	16/12/2005
25	IPCL 94008	ICRISAT- India	16/12/2005

Source : Registre de collecte : Banque de germoplasme. PILGO- Universidad Nacional Agraria La Molina – UNALM. Collecteur : Ing. MSc. Ana María Bautista Salas FUNDP Namur - Belgique. Colaborateurs: Dr. Félix Camarena Mayta UNALM Lima – Pérou, Ing. MSc. Ricardo Chávarry Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo" *Lambayeque* - Pérou, Biol. MSc. Angel Valladolid PROMENESTRAS Instituto Peruano de Leguminosas (IPEL) *Lambayeque* - Pérou.

## 2. Méthodes

### 2.1 Conditions expérimentales

**Situation** : l'essai sur le terrain a été fait dans la parcelle 1 de l'Hacienda "El Tomatillo" de l'Université Nationale Agricole La Molina – UNALM– Lima, Pérou. Cette parcelle est située à 238 m. d'altitude, 12°05'06" de latitude sud et 76°57' de longitude ouest.

**Sol** : l'analyse physico-chimique du sol a révélé qu'il s'agit d'un sol d'origine alluviale, texture sablo-limoneuse, d'une capacité modérée de rétention d'eau et d'une bonne aération. Contenu moyen de phosphore (12,4 ppm), moyenne de potassium (256 kg/Ha), niveau bas de calcium (0,72%), bas en matière organique (1,3%), légèrement alcalin (7,5 pH) sans problème de salinité (1,87 mmhos/cm). Les analyses ont été effectuées dans le Laboratoire du sol et engrais de l'UNALM.

**Climat** : en accord avec les études de Koppen, La Molina présente un climat désertique subtropical, sans pluie et avec une haute humidité relative. Les registres météorologiques moyens pour la période de la culture (mars 2006- avril 2007) ont révélé : une température de 18°C, des précipitations de 00 mm, une humidité relative de l'air de 96% et 12 heures du soleil par jour. Les données météorologiques mensuelles ont été fournies par le Département Académique de Physique et Météorologie de l'UNALM.

**Histoire du champ** : la culture précédente était le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) et le maïs "Chala" (*Zea mays*) en rotation et à l'échelle commerciale, pendant les années 2003 à 2005 (préalables à l'établissement de l'essai).

### 2.2 Design expérimental

L'essai a été conduit en blocs complets au hasard (DBCA). L'essai a été prévu au départ pour un Lattice 5x5, mais finalement vu l'homogénéité du terrain, le design DBCA a été réalisé, avec 2 répétitions ou blocs et 25 accessions par bloc. Chaque parcelle (1 accession /parcelle) a été conformée par 2 sillons de 3,60 m de longueur par 0,90 m de large. Chaque sillon contenait 12 plantes séparées entre elles de 0,30 m, faisant un total de 24 plantes par parcelle et une densité équivalente à 37.037 plantes par hectare. (**figures 12 et 13**).

Chaque observation de l'essai est représentée par une équation linéale :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + E_{ij}$$

$\mu$  : Effet de la moyenne générale

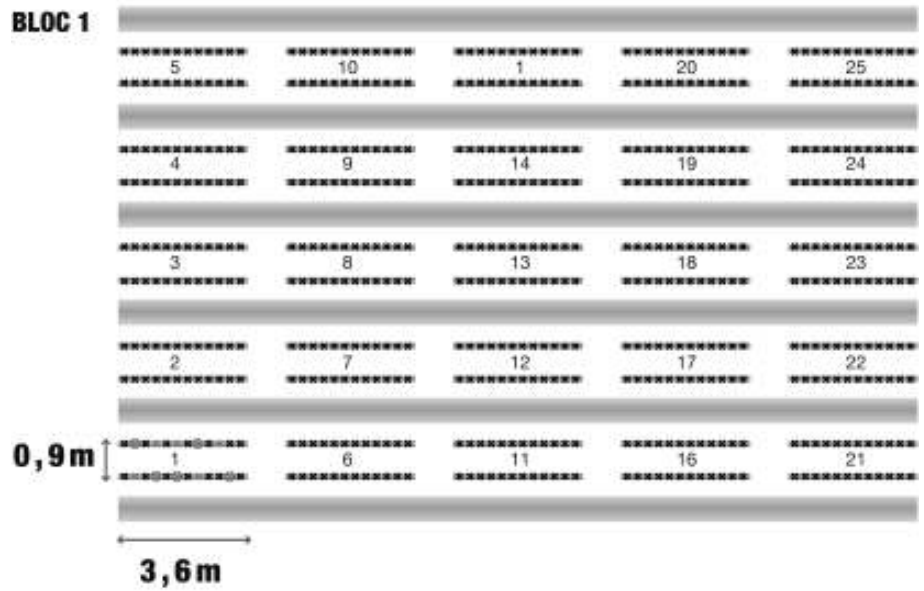
$\alpha_i$  : Effet accession i

$\beta_j$  : Effet bloc j

$E_{ij}$  : Effet Erreur (variance non expliquée ou résiduelle)

## Shéma du dispositif expérimental

### BLOC 1



### BLOC 2

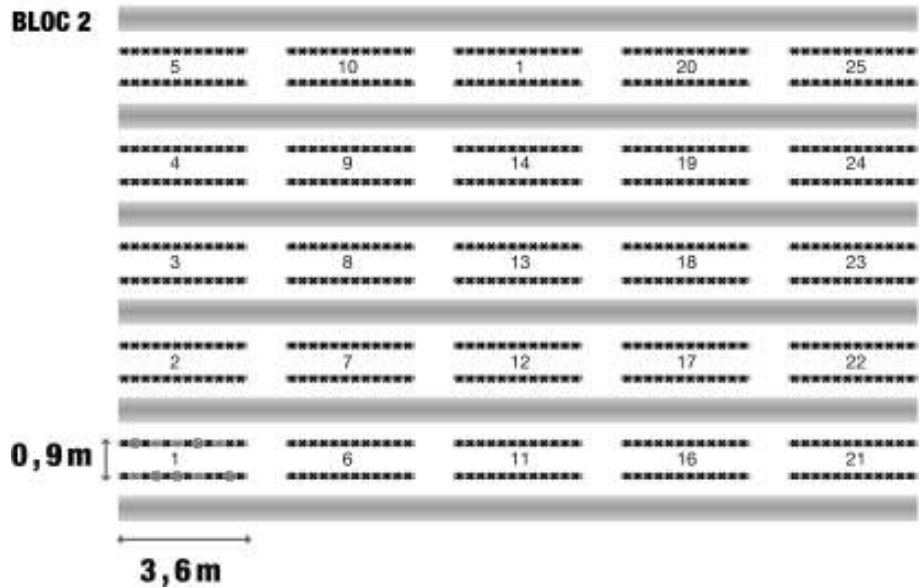
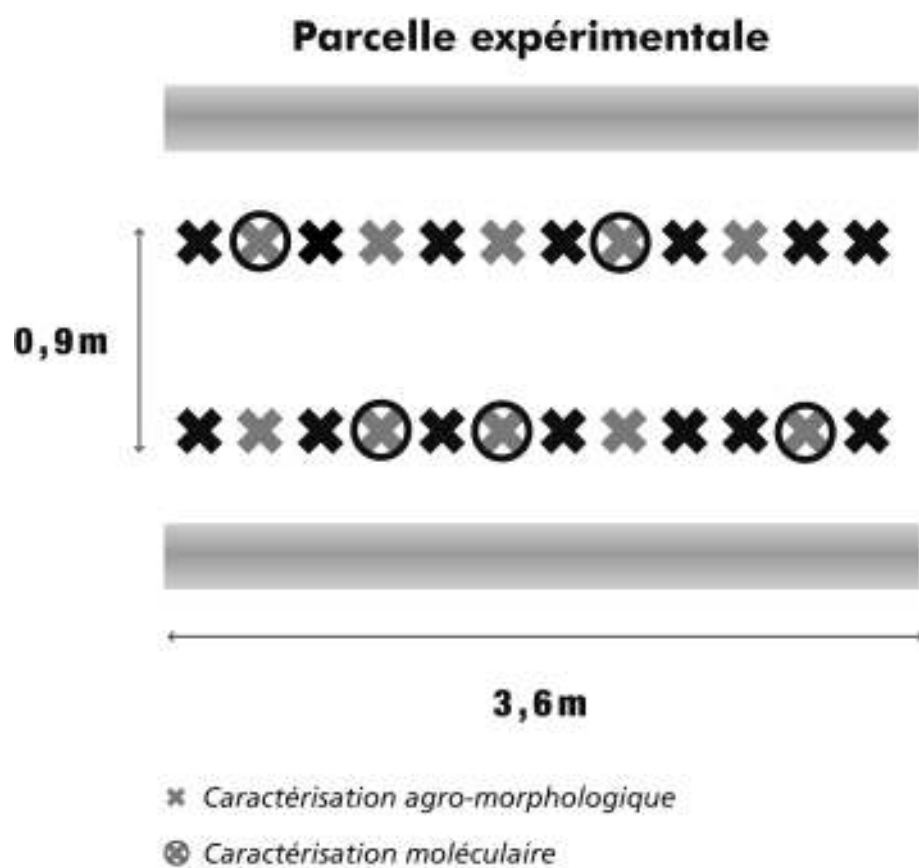


Figure 12 : Schéma du dispositif expérimental, La Molina 2006.



**Figure 13 :** Schéma de la parcelle expérimental, La Molina 2006.

## 2.3 Suivi de l'essai expérimental

L'installation, l'entretien agronomique et la récolte de l'essai ont été effectués en suivant les techniques habituelles d'une culture à l'échelle commerciale. Les tâches de labourage du sol ont été effectuées mécaniquement et les autres tâches d'entretien de l'essai ont été effectuées manuellement. Les activités ayant été réalisées sont les suivantes :

### 2.3.1 L'installation de l'essai

**Le "trempage"** a été réalisé en appliquant 2000 m<sup>3</sup> d'eau par hectare dans une période de 24 heures.

**La préparation du sol** a été effectuée lorsque le sol se trouvait au "point" de labourage, à l'aide de disques (0,20 à 0,25 m de profondeur).

La délimitation du secteur dans des blocs, parcelles, rues et drains a été faite en accord avec les spécifications consignées dans le croquis de l'essai (**figure 12**, pag 70).

**La désinfection de la semence** a été faite en appliquant de l'*Orthene* et du *Rhizolex* (dose de 1 pour mille) de manière à prévenir l'attaque de champignons ainsi que celle d'insectes du sol.

**Le semis** a été effectué à la pelle dans la côte du sillon, en déposant deux semences par trous distants de 0,30 m. Au total, on a semé par parcelle 48 grains dans 24 trous.

**Le repiquage** a été effectué, dans un sol humide, 30 jours après le semis en laissant dans chaque trou une plantule saine et vigoureuse (**figure 66**, page 136), et ceci dans toutes les parcelles (24 plantes par accession par parcelle). Ce qui équivaut à la densité de 37.037 plantes par hectare.

### 2.3.2 L'entretien agronomique

**L'irrigation** a été appliquée par le système de gravité dans les sillons. Les deux premiers arrosages ont été appliqués respectivement 15 et 30 jours après le semis, le troisième et le quatrième à des intervalles de 30 jours. Du cinquième au huitième arrosage, à des intervalles de 45 jours. Au total, un volume approximatif de 4800 m<sup>3</sup> a été appliqué.

**Le contrôle de mauvaises herbes** a été effectué manuellement à six reprises à l'aide d'une pelle. Les mauvaises herbes les plus fréquentes ont été : "verdolaga" (*Portulaca oleracea*), "Amor seco" (*Bidens pilosa*), "cresta de gallo" (*Celosia cristata*) et "pata de gallo" (*Eleusine indica*).

**La fertilisation** a été effectuée 60 jours après le semis quand la plante avait 40cm environ de taille, en ajoutant des engrais (150 gr d'humus, 1,86 gr d'urée, 4,8 gr de superphosphate triple de calcium et 3,6 gr de sulfate de potassium, équivalent à 5,5 tonnes d'humus par hectare et 30-80-80 de NPK/Kg/h).

**Le contrôle sanitaire** a été fait 2 mois après le semis contre l'attaque des "*pulgones*" et des "*cigarritas*" avec du *dimetoato* (dose de 1 pour mille). Dans les étapes de préfloraison et floraison, nous avons détecté des attaques de "*barrenador*" de gousse (*Heliothis virescens*) et "*barrenador*" de bourgeon (*Epinotia aporema*) qui ont été contrôlées par 2 applications de *methomyl*, (dose de 1,5 pour mille), *cypermethrina* (1 pour mille).

Dans les étapes de floraison et de formation de gousses, on a observé des attaques de *Botrytis* et de "pourriture des gousses". Toutes les applications ont été faites manuellement en ajoutant comme adjuvant agricole de l'huile minérale à la combinaison insecticide (dose de 0,5 pour mille).

**Le marquage des plantes** a été effectué à 90 jours après le semis, en choisissant au hasard 10 plantes compétitives par accession pour l'analyse statistique. Celles-ci ont été marquées avec des cartes paraffinées et numérotées de 1 à 10 dans les Blocs I et II.

**Le contrôle de la pollinisation** a été effectué comme une tâche complémentaire au moment de préfloraison, afin d'assurer l'autofécondation, en empêchant la fécondation avec le pollen d'une autre plante. Ainsi, 2 à 3 grappes terminales des plantes marquées ont été couvertes avec des sachets de glycine. Au moment de la récolte, ces graines ont été récoltées séparément afin d'obtenir des semences autofécondées en vue d'études postérieures.

**La sélection de plantes pour l'analyse moléculaire** a été effectuée en choisissant les cinq premières plantes marquées du Bloc I. Le kit *phytoPASS* a été utilisé pour extraire les échantillons d'ADN, en frottant avec un papier abrasif spécial et stérile, l'envers de la foliole centrale (de la partie moyenne de la plante), en portant des gants désinfectés à l'aide d'alcool. (**figure 65**, page 135).

Par après, les échantillons ont été immédiatement introduits dans un sachet identifié et envoyés en Belgique (URBV-FUNDP-Namur) pour l'étude moléculaire.

### 2.3.3 La récolte et le battage

La récolte manuelle a été effectuée lorsque 75% des gousses de chaque parcelle sont arrivées à maturité. Les gousses ont été récoltées et introduites dans des sachets en papier kraft. Les gousses qui n'étaient pas récoltables après la première ou seconde récolte (approximativement 25 %), sont restées sur la plante jusqu'à ce que la totalité des gousses atteignent leur maturité.

Dans l'accession la plus précoce (ICPL 94008 - témoin indien), la première récolte a été effectuée à 146 jours après le semis (31 juillet 2006), et la deuxième à 206 jours (29 septembre 2006). L'accession plus tardive (Mórrope30) a été récoltée à 350 jours après le semis (20 février 2007) et la deuxième récoltée à 410 jours (21 Avril 2007).

Le battage manuel a été effectué lorsque le grain avait 14% d'humidité. Les gousses ont été pesées et comptées. Un échantillon de 25 gousses a ensuite été pris au hasard pour déterminer les caractéristiques des gousses et des grains de chaque accession. Les grains obtenus ont été nettoyés de toute impureté, et gardés dans des sachets de papier kraft bien identifiés.

## 2.4 Caractérisation de la collection

Le choix et l'évaluation des descripteurs ou caractéristiques par plante, ont été effectuées en suivant le Manuel de Descripteurs de *pigeonpea* de l'IBPGR et le "*Estudio Morfológico y Taxonómico del Fríjol de palo para la Región Grau*" de Verschueren (1992). De la même façon, nous avons pris en considération les spécifications données par le CIAT et Laing (1977) et les recommandations de Camarena *et al.* (1991).

Les évaluations des accessions ont été faites sur des plantes préalablement marquées. 10 plantes marqués dans chaque bloc ou répétition, donc 20 plantes au total. Les 5 plantes du bloc I ont servi également pour le prélèvement de l'ADN (échantillons *phytoPASS*) utilisées dans la caractérisation moléculaire.

En accord avec la nature de chaque caractéristique, les évaluations sur le terrain ont été effectuées dans les étapes de préfloraison, floraison, maturation de grains verts, récolte des grains secs et post-récolte. Au total 32 caractéristiques ou descripteurs ont été évalués. Les 15 caractéristiques morphologiques qualitatives (**tableaux 13-A et 13-B**) ont été visuellement évaluées ainsi que les 8 caractéristiques morphologiques quantitatives (**tableau 14**) et les 9 caractéristiques agronomiques (**tableau 15**) ont été mesurées.

## 2.5 Analyses statistiques

Les analyses de variance (ANOVA), et le test de comparaison multiple de Duncan (0.05) ont été réalisés pour les caractéristiques morphologiques et agronomiques quantitatives. L'ANOVA du nombre de branches secondaires et du pourcentage de grains secs, a été effectué après transformation des données, par les formules  $\sqrt{x+1}$  et l'arc sinus, respectivement, pour les adapter à une distribution normale. De même, des analyses multivariées ont été réalisées : l'AFC pour les données qualitatives et l'ACP pour les données quantitatives, en utilisant le programme Minitab.

Les caractéristiques morphologiques quantitatives ont été analysées par une procédure d'agglomération hiérarchisée, en formant des clusters ou des groupes en utilisant le programme Minitab, également. Les groupements ont été faits sur base de la distance entre accessions, celle-ci a été estimée en utilisant la distance euclidienne (Romesburg, 1984). Les distances ont été déterminées graphiquement sur la base de la liaison moyenne entre les groupes (UPGMA "unweighed pair-group method using arithmetic averages"), en élaborant un dendrogramme.

**Tableau 13-A :** Les caractéristiques morphologiques qualitatives du *pigeonpea* évaluées.

Caractéristiques	Sigle	Définition	Période d'observation	Catégories
<b>Plante</b>				
1 Habitude de croissance	HC	Position /direction de la tige principale et ses ramifications par apport à l'axe vertical	Préfloraison	Érigé Incliné
2 Type de Floraison	TF	Présence de bourgeon floral ou végétatif dans l'apex de la tige principale	Floraison	Déterminé Indéterminé
<b>Tige</b>				
3 Insertion de branche	IB	Angle entre la tige principale et les branches primaires végétatives inférieures	Préfloraison	Compact Semi compact Ouvert
4 Pigmentation de la tige	PT	Coloration externe de la tige principale et de ses ramifications	Maturité physiologique	Vert jaune Vert rouge Vert purpurin
<b>Feuille</b>				
5 Forme de folioles	FF	Figure géométrique de folioles des feuilles de la tige principale	Préfloraison	Oblongue Oblongue-lancéolé Lancéolé
<b>Fleur</b>				
6 Pigmentation du calice	PCA	Coloration rouge foncée en lignes longitudinales dans la lèvre supérieure, inférieure ou toutes les deux	Floraison	Type a Type b Type c
7 Couleur de la corolle	CCO	Coloration de la corolle totale ou avec des nervures rougeâtres longitudinales visibles sur le fonds jaune, parfois avec des extensions dans la partie dorsale et ventrale	Floraison	(*)A, RT, RO, RG, ETN, EPN, ETNE, EPNE
*A (Jaune), RT (Rouge tenue), RO (Rouge foncé), RG (Rouge glabre), ETN (Rouge ténu nervures rougeâtres), EPN (Rouge foncé nervures rougeâtres), ETNE (Rouge ténu total), EPNE (Rouge foncé total).				



**Tableau 13-B :** Caractéristiques morphologiques qualitatives du *pigeonpea*.

Caractéristiques	sigle	Définition	Période d'observation	Catégories
Gousse				
8 Couleur de la gousse	CG	Coloration externe de la gousse	Récolte de grains verts	Vert Rose foncé Grenat
9 Couleur secondaire de la gousse	CSGo	Distribution de la pigmentation : totale, en taches ou des bandes roses foncées, mauves à griottes sur la surface ou dans les cavités de la gousse	Récolte de grains verts	Type a Type b Type c
10 Forme de la gousse	FG	Figure géométrique de la gousse et de ses cavités	Récolte de grains verts	droite, courbé, "pecho", "mojarra", "pescado", "falcada"
11 Profil de la gousse	PG	Aspect volumétrique de la gousse	Récolte de grains secs	Plain Cylindrique
Grain				
12 Forme du grain sec	FGS	Figure géométrique du grain	Récolte de grains secs	Ellipse Circuler Réniforme
13 Couleur du grain sec	CGS	Coloration externe du grain, beige ou crème	Récolte de grains secs	Crème Beige clair Beige rose
14 Couleur secondaire de la graine	CSGr	Distribution de pigmentation d'orange à mauve griotte sur la couleur externe du grain	Récolte de grains secs	Sans pig, taches marron, points marron, points marron

**Tableau 14 :** Caractéristiques morphologiques quantitatives du *pigeonpea*.

Caractéristiques	Sigle	Définition	Période d'observation	Unités
<b>Plante</b>				
1 Hauteur de plante	HP	Longueur depuis le col de la plante jusqu'à l'apex de la tige principale	Fin de floraison	m
<b>Tige</b>				
2 Diamètre de la tige	DT	Grosueur de la tige mesurée à 5 cm du col de la plante	Fin de floraison	cm
<b>Branches</b>				
3 Nombre de branches primaires par plante	BP	Somme totale de branches végétatives dans la tige principale	Fin de floraison	unités
4 Nombre de branches secondaires par plante	BS	Somme totale des branches végétatives développées dans des branches primaires	Fin de floraison	unités
5 Nombre de grappes	NG	Somme totale des grappes des branches primaires, secondaires et tige principale	Fin de floraison	unités
<b>Fleur</b>				
6 Longueur de l'axe floral	LAF	Distance depuis la base jusqu'à l'apex de l'axe floral de l'inflorescence du tiers moyen de la tige principale	Fin de floraison	cm
<b>Gousse</b>				
7 Longueur de la gousse	LoG	Distance depuis le réceptacle jusqu'à l'apex de la gousse.	Récolte de grains secs	cm
8 Largeur de la gousse	LaG	Distance entre la partie dorsale et ventrale de la gousse	Récolte de grains secs	cm

**Tableau 15 :** Caractéristiques agronomiques quantitatives du *pigeonpea*.

Caractéristiques	Sigle	Définition	Période d'observation	Unités
<b>Précocité</b>				
1 Jours à 50% de floraison	JF	Nombre de jours depuis le semis jusqu'au début de floraison de 50% de plantes par parcelle	Floraison	jours
2 Maturité physiologique	MF	Nombre de jours depuis le semis jusqu'à la maturité physiologique de 75% des gousses de la parcelle	Maturité physiologique	jours
3 Pourcentage de grains secs à la première récolte	%GS1	Relation entre le poids des grains secs de la première récolte et celui de la récolte totale	Récolte de grains secs	%
<b>Rendement</b>				
4 Rendement de grains verts par plante	RGV	Poids des grains estimé d'un échantillon de 10 gousses par parcelle	Récolte des grains verts	gr
5 Rendement Total de grains verts par plante	RTV	Poids total estimé d'un échantillon de 10 gousses par parcelle	Récolte des grains verts	gr
6 Nombre de gousses par plante	NGo/P	Nombre total de gousses récoltées par plante	1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> récolte de grains secs	unités
7 Nombre de grains par gousse	NGr/G	Nombre moyen de grains par gousse sur la base d'un échantillon de 25 gousses par plante	1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> récolte de grains secs	unités
8 Poids de 100 grains	P100G	Poids moyen d'un échantillon de 100 grains	1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> récolte de grains secs	gr
9 Rendement de grains secs par plante	RGS1 RGS2 RGST	Poids de grains secs par plante à 14% d'humidité	1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> récolte de grains secs	gr

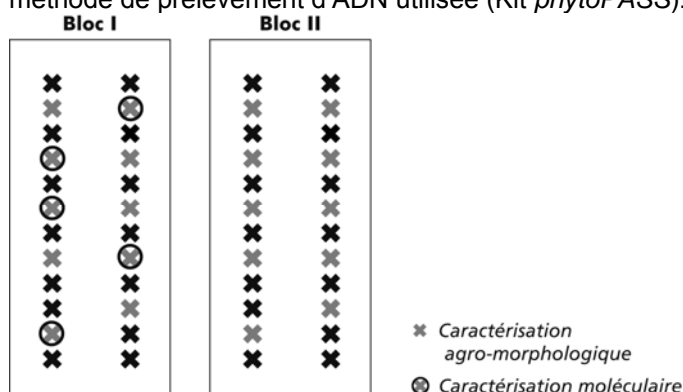
## RÉSULTATS ET DISCUSSION

La caractérisation de la collection de *pigeonpea* a été basée sur deux types de descripteurs: descripteurs qualitatifs et descripteurs quantitatifs. Afin de réaliser l'analyse et l'interprétation des résultats, un traitement différent a été appliqué pour chacun de ceux deux types de descripteurs, les analyses sont présentées séparément.

Pour la **caractérisation qualitative**, 14 descripteurs qualitatifs morphologiques ont été considérés. La variabilité intra et entre accessions pour chacun des descripteurs qualitatifs a été analysée en fonction des pourcentages de critères caractérisant les accessions.

Une analyse multivariée (AFC) nous a permis de déterminer la correspondance entre plusieurs caractères indépendants en considérant les 14 descripteurs qualitatifs et seulement 6 d'entre eux de haute variabilité (Verschueren, 1992). L'étude de Verschueren (1992) met en évidence la haute variabilité génétique du *pigeonpea*, pour les caractéristiques de : la forme des folioles, la couleur de la corolle, la forme de la gousse, la forme de la graine, la couleur et la couleur secondaire de la graine ainsi que le type d'inflorescence. En effet 6 descripteurs qualitatifs morphologiques de haute variabilité ont été analysés séparément, afin d'observer si en prenant en compte seulement les descripteurs de plus haute variabilité, on pourrait expliquer le maximum de variabilité de la collection. **Le tableau 16** présente un récapitulatif des analyses réalisées pour les descripteurs qualitatifs.

Un autre aspect pris en considération dans cette analyse a été la taille de l'échantillonnage : 20 plantes et 5 plantes (**figure 14**). Il est important mentionner que notre étude comprend une caractérisation phénotypique et une caractérisation moléculaire. Des moyennes de 20 plantes par accession ont été utilisées dans l'analyse phénotypique (10 plantes du bloc I et 10 plantes du bloc II). De ces 20 plantes, 5 plantes ont servi à la caractérisation moléculaire (5 plantes par accession du bloc I), ces dernières que nous appellerons les 5 plantes-*phytoPASS*, en référence à la méthode de prélèvement d'ADN utilisée (Kit *phytoPASS*).



**Figure 14** : Plantes échantillonnées par accession pour la caractérisation agro-morphologique et la caractérisation moléculaire.

**Tableau 16** : Récapitulatif des analyses réalisées dans la caractérisation phénotypique qualitative de la collection.

CARACTERISATION QUALITATIVE			
Descripteurs Qualitatifs Morphologiques			
1	HC	Habitude de croissance	
2	TF	Type de Floraison	
3	IB	Insertion de branche	
4	PT	Pigmentation de la tige	
5	PCA	Pigmentation du calice	
6	CG	Couleur de la gousse	
7	CSGo	Couleur secondaire de la gousse	
8	PG	Profil de la gousse	
Descripteurs Qualitatifs de haute variabilité (Verschueren 1992)			
9	FF	Forme de folioles	
10	CCO	Couleur de la corolle	
11	FG	Forme de la gousse	
12	FGS	Forme du grain sec	
13	CGS	Couleur du grain sec	
14	CSGr	Couleur secondaire de la graine	
Analyse de la variabilité			
Entre accessions et intra-accessions			
Analyse de corrélation			
Analyse factorielle de correspondances (AFC)			
de 14 descripteurs		de 6 descripteurs de haute variabilité	
Sur base de 20 plantes	Sur base d'un échantillon de 5 plantes <i>phytoPASS</i>	Sur base d'un échantillon de 20 plantes	Sur base d'un échantillon de 5 plantes <i>phytoPASS</i>

Pour la **caractérisation quantitative**, 17 descripteurs quantitatifs ont été évalués. Tout d'abord nous avons mis en évidence la variabilité de la collection de *pigeonpea* en utilisant une analyse de la variance (ANOVA) selon le model de DBCA et une comparaison des moyennes selon le test de Duncan. Ensuite une analyse de corrélation simple entre caractères a été réalisée (Pearson), pour voir la corrélation entre paires de caractères, ce qui nous a permis d'analyser seulement 14 d'entre eux grâce a une analyse multivariée (ACP) de seulement 14 descripteurs, 8 morphologiques et 6 agronomiques. Finalement, grâce aux analyses clusters nous avons déterminé les groupes formés.

Comme pour la caractérisation qualitative, la taille de l'échantillonnage a été prise en compte. Ainsi dans les analyses multivariés (AFC, ACP et analyses clusters) on a utilisé les moyennes de 20 plantes par accession et de 5 plantes (*phytoPASS*). Un récapitulatif des analyses réalisées pour les descripteurs quantitatifs se présente dans le **tableau 17**, et nous passerons ensuite aux résultats détaillés.

**Tableau 17 :** Récapitulatif des analyses réalisées dans la caractérisation agro-morphologique quantitative de la collection.

CARACTERISATION QUANTITATIVE		
Descripteurs Quantitatifs Agro-morphologiques		
1	HP	Hauteur de plante
2	DT	Diamètre de la tige
3	BP	Nombre de branches primaires par plante
4	BS	Nombre de branches secondaires par plante
5	NG	Nombre de grappes
6	LAF	Longueur de l'axe floral
7	LoG	Longueur de la gousse
8	LaG	Largeur de la gousse
9	JF	Jours à 50% de floraison
10	%GS1	Pourcentage de grains secs à la première récolte
11	NGo/P	Nombre de gousses par plante
12	NGr/G	Nombre de grains par gousse
13	P100G	Poids de 100 grains
14	RGST	Rendement de grains secs total
<b>Analyse de la variabilité</b>		
Analyse de la variance (ANOVA) model DBCA		
<b>Analyse de corrélation</b>		
Matrice de corrélation simple (Pearson)		
Analyse en composantes principales (ACP)		
Sur base de <b>20</b> plantes		Sur base de <b>5</b> plantes <i>phyto-PASS</i>
<b>Analyse de clusters</b>		
Sur base de <b>20</b> plantes		Sur base de <b>5</b> plantes <i>phyto-PASS</i>

## 1. Caractérisation qualitative

Dans cette partie, nous mettrons en évidence la variabilité de la collection de *pigeonpea* à l'aide des 14 descripteurs qualitatifs morphologiques et ensuite à l'aide d'une analyse multivariée nous examineront cette variabilité.

### 1.1 Descripteurs qualitatifs – morphologiques

En premier lieu, nous nous occuperons de la variabilité de descripteurs qualitatifs chez la collection du *pigeonpea* en prenant en compte la variabilité intra-accession. En suite nous verrons comment les différentes catégories de descripteurs se présentent dans l'ensemble des accessions péruviennes.

#### 1.1.1 Variabilité de descripteurs qualitatifs intra-accessions

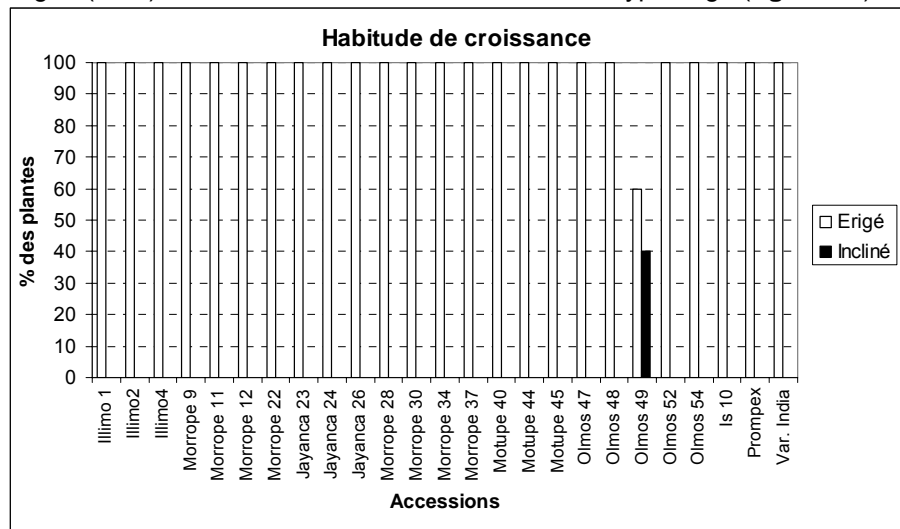
La caractérisation qualitative de la collection se composant des 25 accessions de *pigeonpea* a été faite sur base de descripteurs présentés

dans le **tableau 16** (page 80). Les différentes catégories sont reprises en détail dans les **tableaux 13A et 13B** (pages 75-76).

Les résultats de cette caractérisation en utilisant 20 plantes par accession sur base de descripteurs exprimés en pourcentage sont présentés dans les **tableaux 18-19 et 20** (pages 83-85). Les **figures 15 à 28** représentent graphiquement la variabilité au sein de la collection.

Quand la taille de l'échantillon est de 20 plantes, on observe que certaines accessions sont homogènes pour certains descripteurs et d'autres où on peut observer plusieurs critères, donc une richesse intra variétal à prendre en compte.

Si on analyse descripteur par descripteur, la variabilité de l'**habitude de croissance** par exemple, seule l'accession **Olmos49** présente les deux critères alternatifs du descripteur : habitude inclinée (40%) et habitude érigée (60%). Les autres accessions sont toutes de type érigé (**figure 15**).



**Figure 15** : Variabilité intra accession de l'habitude de croissance de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

**Tableau 18 :** Evaluation en pourcentage des descripteurs qualitatifs des accessions de *pigeonpea* (20 plantes).

Caract.	Sigle	Catégorie	Accessions																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Habitude de croissance	HC	111	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	60	100	100	100	100	100
		112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-
		121	100	100	100	100	100	40	90	45	10	100	100	100	35	100	100	100	100	-	100	100	100	100	100	-	100	100
Type de floraison	TF	122	-	-	-	-	60	10	55	90	-	-	-	65	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	100	-	-	-
		131	100	-	-	-	-	10	-	-	75	100	15	-	-	-	-	-	20	-	-	-	5	-	-	-	-	-
		132	-	100	100	100	100	70	80	70	25	-	85	35	55	100	100	80	-	95	100	85	100	5	100	100	100	100
Insertion de branche	IB	133	-	-	-	-	-	20	20	30	-	-	-	65	45	-	-	-	100	5	-	10	-	95	-	-	-	-
		141	100	95	100	95	95	50	100	80	35	100	65	100	70	100	100	80	80	90	100	95	95	35	100	100	100	100
		142	-	5	-	5	5	20	-	20	65	-	35	-	30	-	-	-	15	5	5	5	5	65	-	-	-	-
Pigmentation de la tige	PT	143	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	
		211	65	85	70	15	65	90	100	45	10	70	50	100	35	25	85	100	100	100	80	75	45	95	80	85	100	
		212	20	15	5	10	20	5	-	10	5	20	15	-	20	10	5	-	-	-	5	20	25	-	10	15	-	-
Forme de folioles	FF	213	15	-	25	75	15	5	-	45	85	10	35	-	45	65	10	-	-	-	15	5	30	5	10	-	-	-
		311	5	-	-	-	5	20	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	5	75	-	65	-	-	-	-	5	
		312	75	45	-	95	90	80	65	85	90	-	100	100	90	15	50	95	95	25	85	20	100	90	100	-	70	
Pigmentation du calice	PC	313	20	55	100	5	5	-	35	15	10	100	-	-	10	70	50	5	-	-	15	15	-	10	-	100	25	



**Tableau 19 :** Evaluation en pourcentage des descripteurs qualitatifs des accessions de *pigeonpea* (20 plantes).

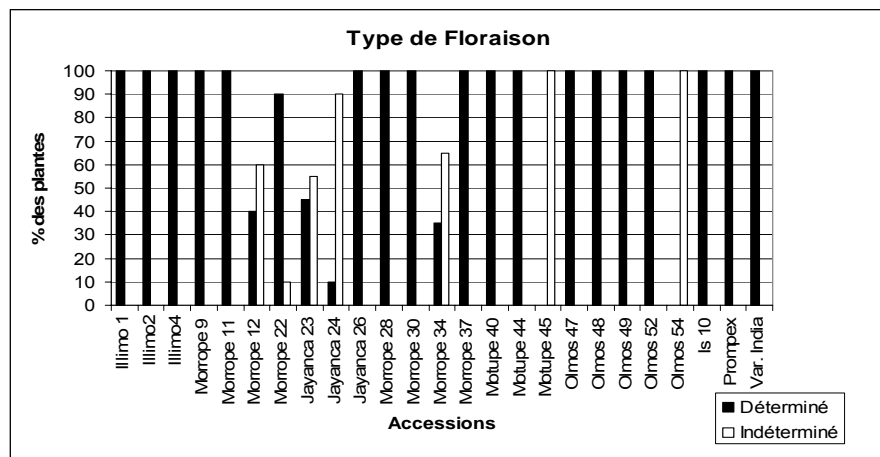
Caract.	Sigle	Catégorie	Accessions																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Couleur de la corolle	OOO	321	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	20
		322	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	75	-	60	-	-	-	-	-	-
		323	80	5	90	10	-	-	65	50	-	-	-	-	10	20	60	10	-	20	80	5	-	-	-	-	-	60
		324	5	20	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	10	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	100	-
		325	-	5	-	65	65	95	-	50	85	-	100	10	30	30	10	45	85	5	-	-	-	5	85	-	-	20
		326	5	-	-	20	35	5	-	-	-	-	-	90	-	-	5	30	15	-	-	-	-	95	-	-	-	-
		327	-	10	-	5	-	-	10	-	-	-	-	-	-	10	5	15	-	-	5	25	-	-	-	-	-	-
		328	5	30	10	-	-	-	25	-	15	-	-	-	-	15	20	-	-	-	5	10	-	15	-	-	-	-
Couleur de la gousse	OG	411	5	30	-	-	15	95	-	-	85	-	90	5	65	55	-	-	80	80	-	70	-	85	80	-	-	-
		412	85	15	95	80	5	-	75	45	-	-	-	-	10	10	70	50	-	20	85	25	-	-	-	-	-	
		413	10	55	5	20	80	5	25	55	15	100	10	95	25	35	30	50	20	-	15	5	100	15	20	100	100	100
Couleur secondaire gousse	CSGO	421	90	70	100	20	15	95	95	50	85	-	90	-	75	55	70	20	80	100	85	75	-	85	80	-	-	-
		422	-	5	-	80	75	5	5	-	-	-	10	100	20	5	15	80	20	-	10	-	-	-	-	-	-	-
		423	10	25	-	-	10	-	-	50	15	100	-	-	5	40	15	-	-	-	5	25	100	15	20	100	100	100

**Tableau 20 :** Evaluation en pourcentage des descripteurs qualitatifs des accessions de *pigeonpea* (Moyenne de 20 plantes).

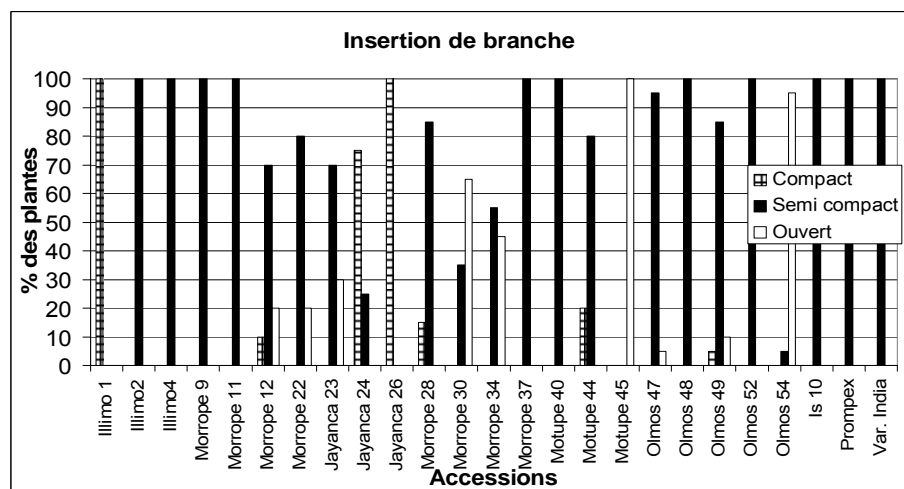
Caract.	Sigle	Catégorie	Accessions																								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Forme de la gousse	FG	431	90	100	-	40	-	30	35	55	90	100	90	-	80	85	30	-	100	100	30	-	100	-	100	100	100
		432	5	-	-	-	-	-	65	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-	35	-	-	-
		434	-	-	100	-	100	45	-	-	-	-	-	100	-	-	70	100	-	-	5	100	-	-	-	-	-
		435	-	-	-	60	-	25	-	-	10	-	10	-	20	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		436	5	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-
Profil de la gousse	PG	511	10	-	100	60	100	70	65	50	10	-	15	100	30	25	85	100	-	15	70	100	100	75	100	-	-
		512	90	100	-	40	-	30	35	50	90	100	85	-	70	75	15	-	100	85	30	-	-	25	-	100	100
		711	55	80	55	10	30	65	15	45	-	-	-	-	80	25	80	-	-	-	15	-	100	-	-	-	-
		712	20	20	45	90	70	35	85	55	100	100	100	100	20	75	20	100	100	100	85	100	-	-	-	100	100
		713	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-	-
Couleur du grain sec	CGS	721	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-	-
		722	80	100	100	100	30	35	10	85	75	100	100	-	70	-	-	65	-	45	90	80	100	-	-	100	100
		723	20	-	-	-	70	65	90	15	25	-	-	100	30	100	100	35	100	55	10	20	-	-	-	-	-
		731	-	-	-	-	-	20	-	-	85	-	90	30	75	-	-	-	85	25	-	60	-	5	-	-	-
Couleur secondaire du grain sec	CSGr	732	-	-	-	-	25	80	-	-	-	35	-	70	15	30	-	25	10	75	15	20	-	40	-	20	25
		733	100	100	100	100	75	-	100	100	15	65	10	-	10	70	100	75	5	-	85	20	100	55	100	80	75

Pour le **type de floraison**, **Morrope12**, **Morrope22**, **Jayanca23**, **Jayanca24**, **Morrope34**, présentent les deux types alternatifs : déterminé et indéterminé. Motupe45 et Olmos54 sont toutes de type indéterminé, les accessions restantes sont toutes déterminées (**figure 16**).

Pour **l'insertion de branches**, Morrope12 ; Morrope22, Morrope23, Jayanca24, Morrope28, Morrope30, Morrope34, Motupe44, Olmos47, Olmos49, Olmos54 présentent différents pourcentages tous des trois types de catégories. La totalité des individus évalués de Motupe45 sont de type ouvert. Illimo1, Jayanca26, sont de type compact. Les accessions Illimo2, Illimo4, Morrope9, Morrope11, Morrope37, Motupe40, Olmos48, Olmos52, ISO10, Prompex et la variété indienne présentent une insertion de branche semi compacte. (**figure 17**).



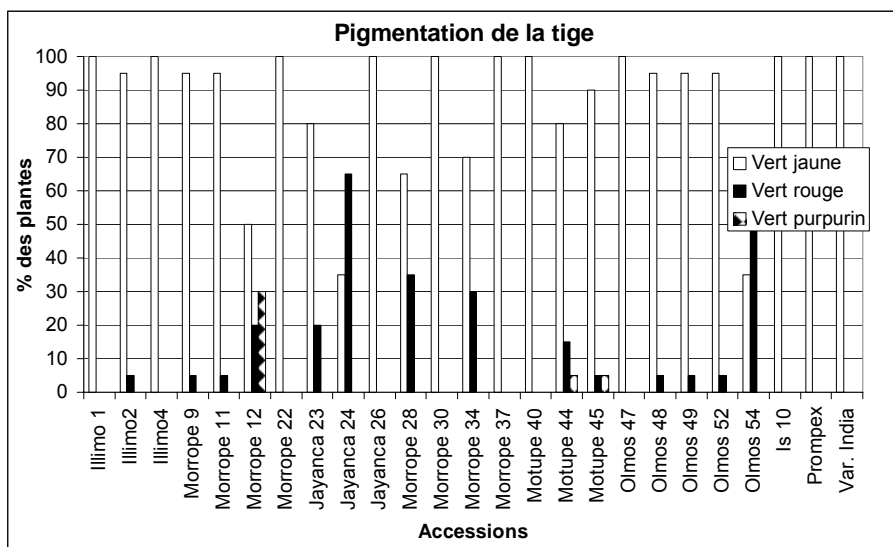
**Figure 16** : Variabilité intra accession du type de floraison de 25 accessions de une collection de *pigeonpea*.



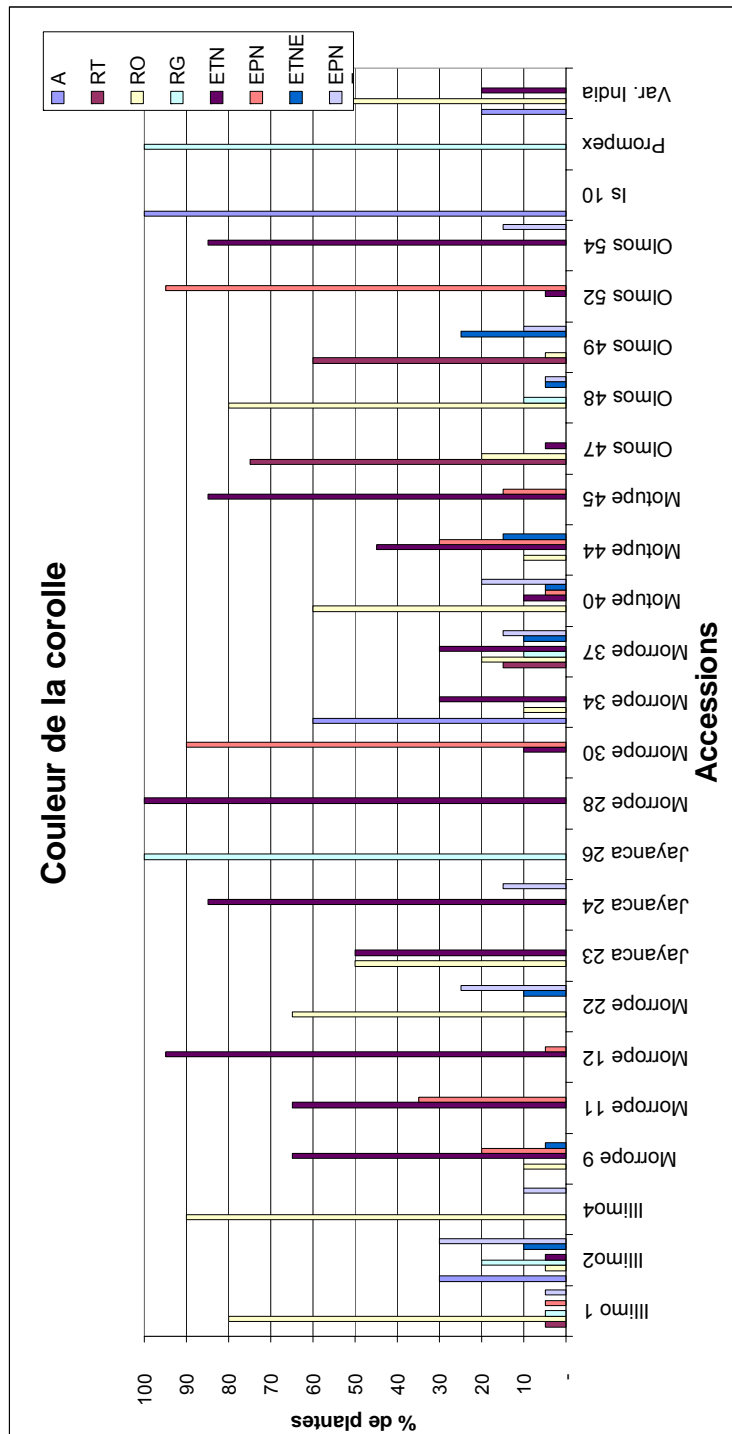
**Figure 17** : Variabilité intra accession de l'insertion de branche de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

Pour la **pigmentation de la tige**, Illimo2, Morrope9, Morrope11, Morrope12, Jayanca23, Jayanca24, Morrope28, Morrope34, Motupe44, Motupe45, Olmos48, Olmos49, Olmos52 et Olmos54 ; présentent les trois types de pigmentation. Les accessions qui présentent la couleur verte-purpurine en différents pourcentages sont Morrope12, Motupe44, et Motupe45. Les accessions Illimo1, Illimo4, Morrope22, Jayanca26, Morrope30, Morrope37, Motupe40, Olmos47, ISO10, Prompex et la variété indienne présentent une couleur de tige vert-jaune (**figure 18**).

Pour la **couleur de la corolle** les accessions Jayanca26 et Prompex ont la corolle (RG) : rose glabre de même intensité que la partie dorsale, avec une nervure invisible et avec une tache inférieure ventrale. L'accession Morrope28 a la corolle (ETN) : rouge tenue nervure rouges. La variété ISO10 a la corolle jaune sans pigmentation secondaire (A). Le reste des accessions a une grande variabilité intra-accession (**figure19**).



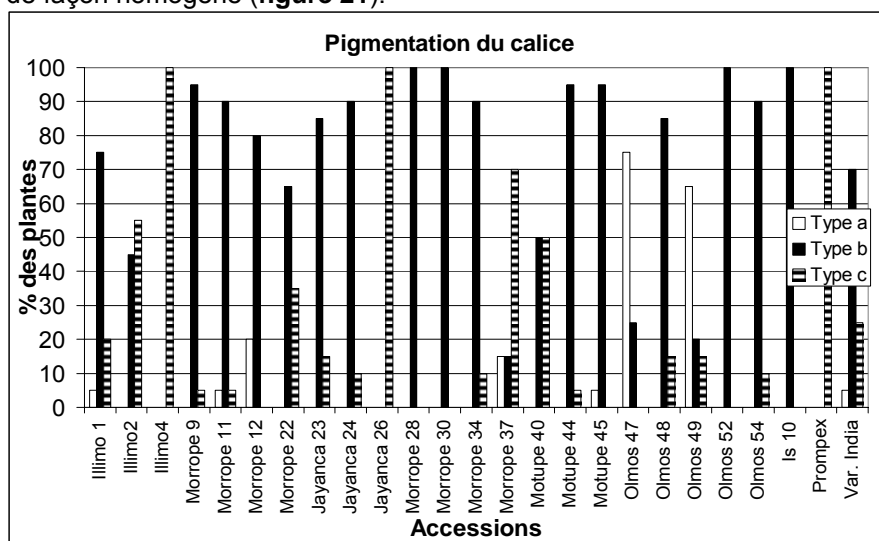
**Figure 18** : Variabilité intra accession de la pigmentation de la tige de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*



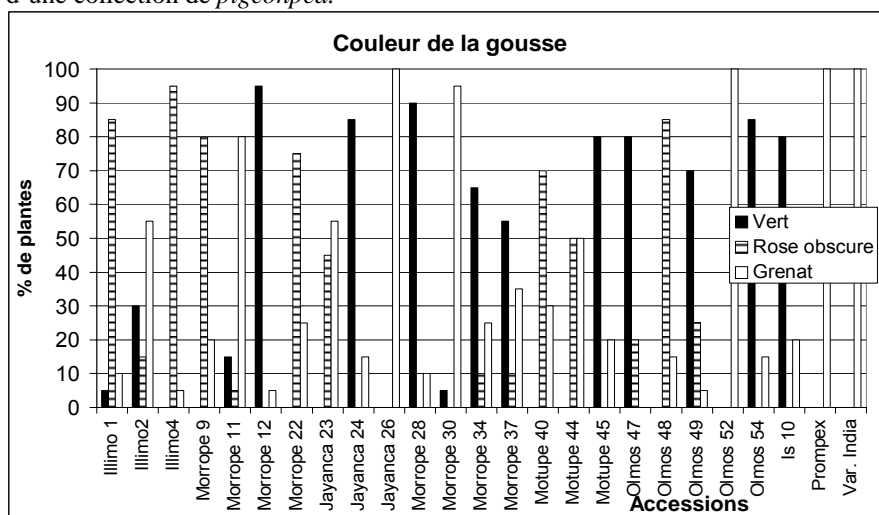
**Figure 19** : Variabilité intra accession de la couleur de la corolle de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

Pour la **pigmentation du calice**, on observe une variabilité intra accession dans toutes les accessions à l'exception de Illimo4, Jayanca26 et Prompex qui ont une pigmentation de type c (pigmentation de la lèvre supérieure et inférieure). De plus, les accessions Morrope28, Morrope30, Olmos52, ISO10 ont toutes une pigmentation de type b (pigmentation de la lèvre supérieure) (**figure 20**).

Pour la **couleur de la gousse**, on observe une forte variabilité intra accession pour toutes les accessions à l'exception de Jayanca26, Olmos52, Prompex2000 et de la variété indienne qui ont une couleur de gousse grenat de façon homogène (**figure 21**).



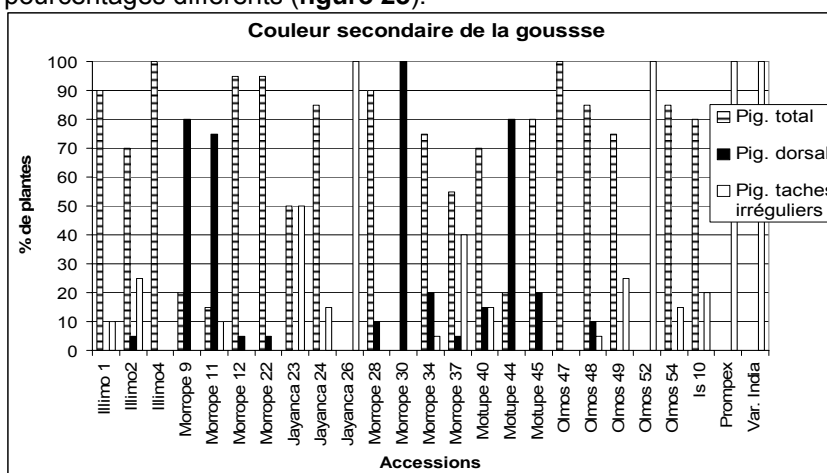
**Figure 20** : Variabilité intra accession de la pigmentation du calice de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.



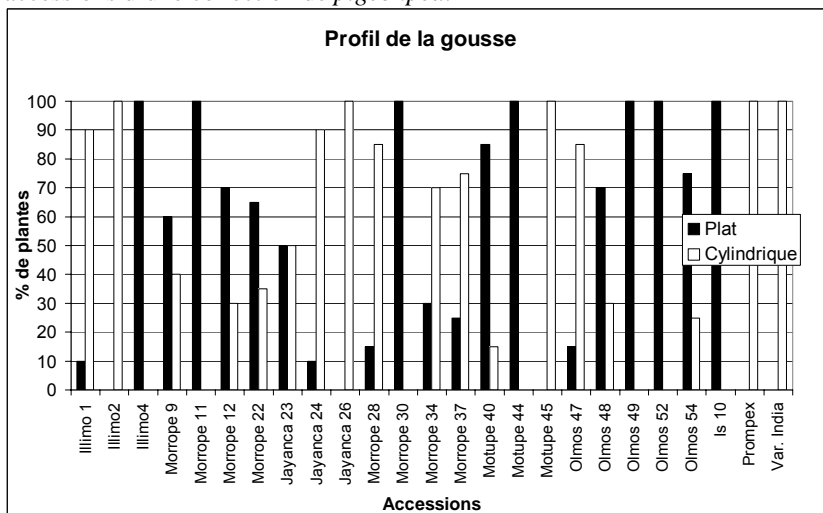
**Figure 21** : Variabilité intra accession de la couleur de la gousse de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

Pour la **couleur secondaire de la gousse**, la Illimo4 et Olmos47 ont une pigmentation totale de la gousse. Morrope30 est la seule à avoir une pigmentation dorsale. Les accessions Jayanca26, Olmos52, Prompex et la variété indienne ont une pigmentation secondaire de taches irrégulières. Le reste des accessions présente une variabilité intra accession exprimée par la présence des trois types de pigmentation en proportions différentes (**figure 22**).

Pour le **profil de la gousse**, les accessions Illimo4, Morrope11, Morrope30, Motupe44, Olmos49, Olmos52 et ISO10 ont un profil plat. Les accessions Illimo2, Jayanca26, Motupe45, Prompex et la variété indienne ont un profil cylindrique, les autres ont les deux types de profil en pourcentages différents (**figure 23**).

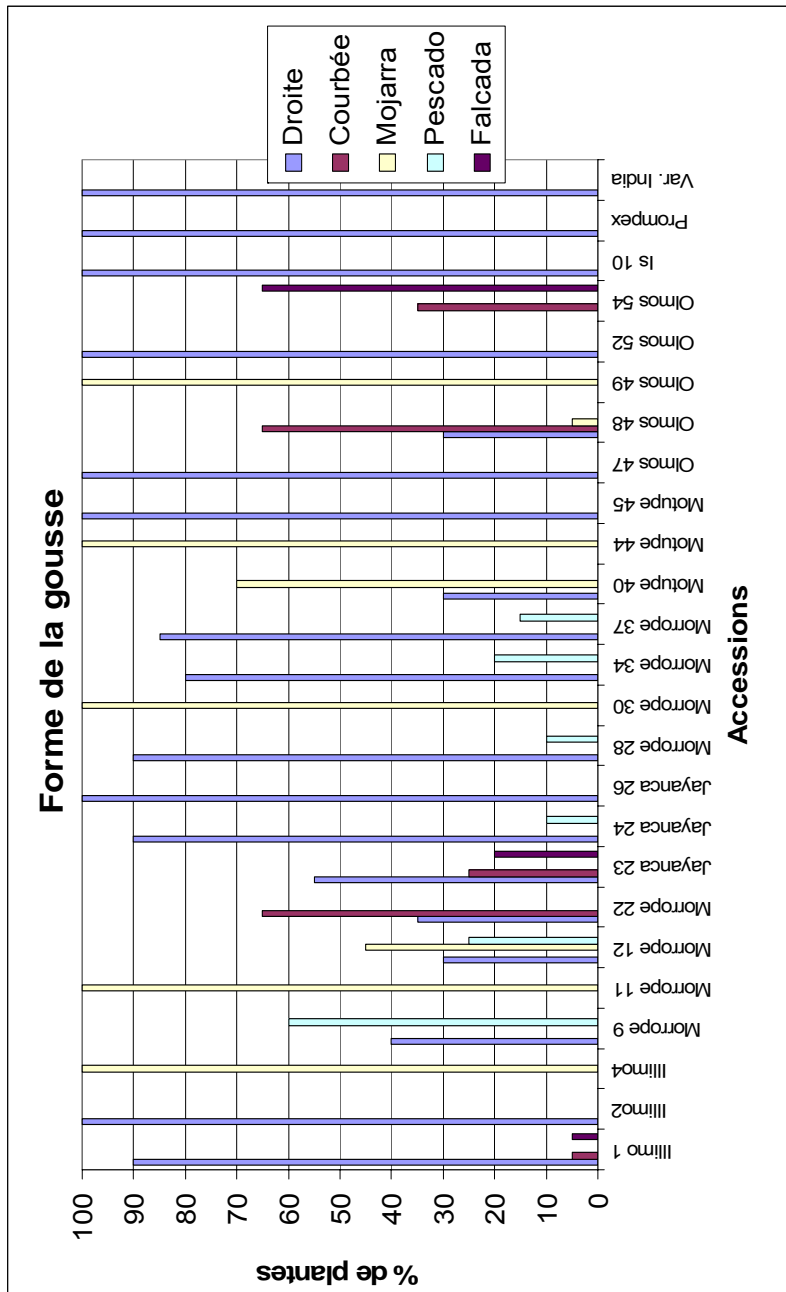


**Figure 22:** Variabilité intra accession de la couleur secondaire de la gousse de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.



**Figure 23 :** Variabilité intra accession du profil de la gousse de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

Pour la **forme de la gousse**, la forme droite caractérise les accessions Illimo2, Jayanca26, Motupe45, Olmos47, Olmos52, Prompex et la variété indienne. La forme *mojarra* caractérise les accessions Illimo4, Morrope11, Morrope30, Motupe44 et Olmos49. Le reste des accessions présente à la fois deux ou trois formes de gousses différentes (**figure 24**).

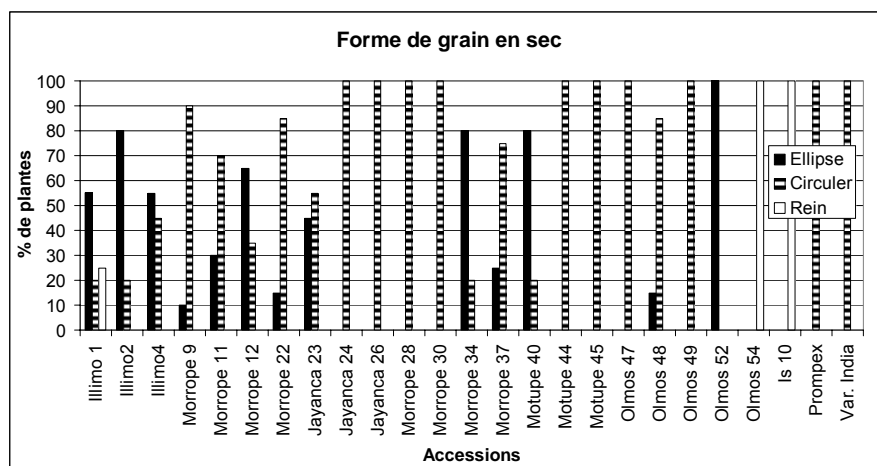


**Figure 24:** Variabilité intra accession de la forme de la gousse de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

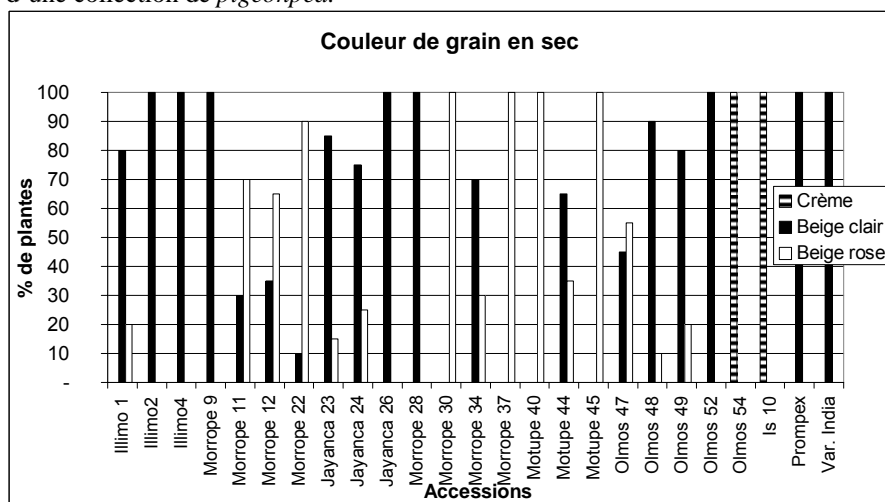


Pour la **forme du grain sec**, la forme réniforme caractérise les accessions Olmos54 et ISO10. L'accession Olmos52 a une forme de grain elliptique. La forme circulaire caractérise les accessions Jayanca24, Jayanca26, Morrope28, Morrope30, Motupe44, Motupe45, Motupe47, Olmos49, Prompex ainsi que variété indienne. Le reste des accessions présente plus d'un type de forme de grain (**figure 25**).

Pour la **couleur du grain sec**, la couleur crème caractérise les accessions Olmos54 et ISO10. La couleur beige rose caractérise les accessions Morrope30, Morrope37, Motupe40 et Motupe45. La couleur beige clair caractérise les accessions Illimo2, Illimo4, Morrope9, Jayanca26, Morrope28, Olmos52, Prompex et la variété indienne. Le reste des accessions présente plus d'un type de couleur (**figure 26**).



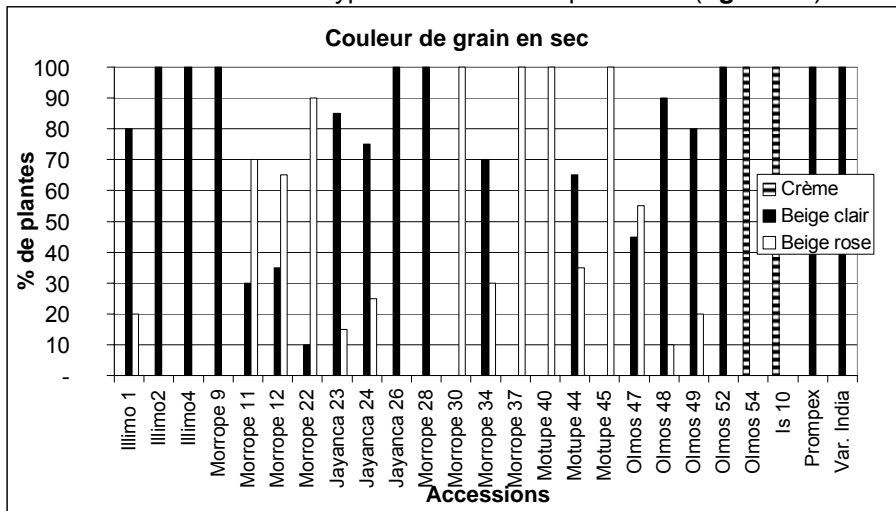
**Figure 25** : Variabilité intra accession de la forme de grain en sec de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.



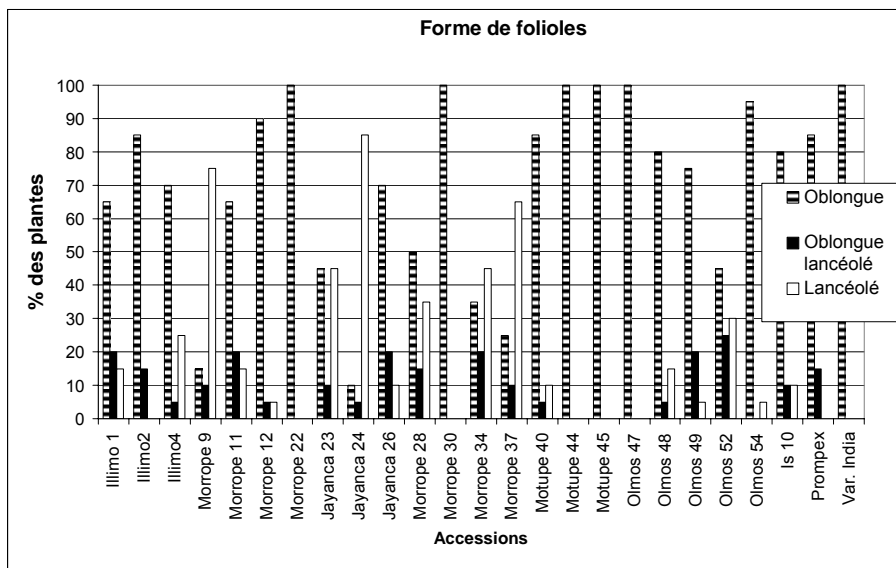
**Figure 26** : Variabilité intra accession de la couleur de grain en sec de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

Pour la **couleur secondaire du grain sec**, le grain avec des taches marron caractérise les accessions Illimo1, Illimo2, Illimo4, Morrope9, Morrope22, Morrope23, Motupe40, Olmos52 et ISO10. Le reste des accessions présente plus d'un type de couleur secondaire (**figure 27**).

Pour la **forme de folioles**, les accessions Morrope22, Morrope30, Motupe44, Motupe45, Olmos47 et la variété indienne ont exclusivement les folioles de forme oblongue. Le reste des accessions présente une variabilité intra-accession où les trois types de forme sont présentes (**figure 28**).



**Figure 27** : Variabilité intra accession de la couleur secondaire du grain sec de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.



**Figure 28** : Variabilité intra accession de la forme de folioles de 25 accessions d'une collection de *pigeonpea*.

La caractérisation morphologique des accessions étudiées a mis en évidence une variabilité intra accession, observable parmi les 46 catégories possibles des 14 descripteurs utilisés chez les 25 accessions étudiées.

On a mis en évidence l'homogénéité de l'accession **Jayanca26** et de la variété **Prompex2000** pour 12 descripteurs qualitatifs (**tableau 21, pag 95**). Elles se caractérisent par une habitude de croissance de type érigée, un type de floraison déterminé, une insertion de branche compacte, une pigmentation vert-jaune de la tige, une pigmentation du calice du type c, une couleur grenat de la gousse avec des taches, un profil de gousse cylindrique, une couleur de la corolle RG (rose glabre de même intensité que la partie dorsale, nervure invisible avec tache inférieure ventrale), une forme de la gousse droite, une forme de grain sec circulaire et enfin, une couleur du grain sec beige claire.

Dans des études comme celle de Upadhyaya *et al.*, (2005), la variation de 14 traits qualitatifs et de 12 quantitatifs dans 11.402 accessions de germoplasme de *pigeonpea*, de 54 pays, a été analysé. L'habitude de croissance inclinée, la couleur verte de la tige, le type de floraison indéterminée et la couleur jaune de la fleur étaient prédominants parmi les traits qualitatifs. De même, la couleur du grain a eu la variabilité maximale. La couleur orange suivie de la couleur crème étaient les deux couleurs de grain les plus fréquentes dans la collection.

Verschueren (1992) met en évidence la haute variabilité génétique du *pigeonpea*, ainsi, il considère comme caractéristiques importantes : la forme des folioles, la couleur de la corolle, la forme de la gousse, la forme de la graine, la couleur et la couleur secondaire de la graine ainsi que le type d'inflorescence.

Manyasa *et al.* (2008) dans l'étude de la diversité des *landraces* de *pigeonpea* en Tanzanie ont rassemblé un total de 123 *landraces* de *pigeonpea* de quatre secteurs principaux de production. Les accessions ont été caractérisées par leur diversité de 16 traits qualitatifs et de 14 quantitatifs. Dans l'étude, une variabilité significative pour des traits qualitatifs comme la couleur de la corolle, la couleur de la gousse, le type de floraison, la couleur des grains et la forme des grains. Dans cette étude, les collections nordiques de montagne ont montré la plus basse diversité due probablement à la sélection des variétés sur la des caractéristiques préférées pour le marché.

Dans notre étude, la variété améliorée **ISO10** est homogène pour 11 descripteurs. Elle se caractérise par une habitude de croissance de type érigée, un type de floraison déterminé, une insertion de branche semi-compacte, une pigmentation vert-jaune de la tige, une pigmentation du calice du type b, un profil de gousse plat, une couleur de la corolle A (jaune sans pigmentation secondaire), une forme de la gousse droite, et une forme de grain sec réniforme avec de taches.

On observe clairement aussi que **Morrope30** est une accession homogène pour 10 descripteurs qualitatifs, entre autres la forme de la gousse *mojarra*, la pigmentation dorsale de la gousse, la forme des folioles oblongue et la couleur de grain sec beige rose.

**Tableau 21 :** Caractérisation de la collection sur base de 14 descripteurs qualitatifs et de 20 plantes par accession.

N°	Accession	HC	TF	IB	PT	PCA	CG	CSGo	PG	FF	CCO	FG	FGS	CGS	CSGr
1	Illino 1	érigée	deter	compact	vert-jaune	3	3	2	2	3	5	3	3	2	taches
2	Illino 2	érigée	deter	semicompact	2	2	3	3	cylindrique	2	6	droite	2	beige clair	taches
3	Illino 4	érigée	deter	semicompact	vert-jaune	type c	2	plg total	plat	3	2	mojarra	2	beige clair	taches
4	Morrope 9	érigée	deter	semicompact	2	2	2	2	2	3	4	2	2	beige clair	taches
5	Morrope 11	érigée	deter	semicompact	2	3	3	3	plat	3	2	mojarra	2	2	2
6	Morrope 12	érigée	2	3	3	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2
7	Morrope 22	érigée	2	2	vert-jaune	2	2	2	2	oblongue	3	2	2	2	taches
8	Jayanca 23	érigée	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	taches
9	Jayanca 24	érigée	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	circuler	2	2
10	Jayanca 26	érigée	deter	compact	vert-jaune	type c	grenat	taches	cylindrique	3	RG	droite	circuler	beige clair	2
11	Morrope 28	érigée	deter	2	2	type b	2	2	2	3	ETN	2	circuler	beige clair	2
12	Morrope 30	érigée	deter	2	vert-jaune	type b	2	dorsale	plat	oblongue	2	mojarra	circuler	beige rose	2
13	Morrope 34	érigée	2	2	2	2	3	3	2	3	3	2	2	2	3
14	Morrope 37	érigée	deter	semicompact	vert-jaune	3	3	3	2	3	6	2	2	beige rose	2
15	Molupe 40	érigée	deter	semicompact	vert-jaune	2	2	3	2	3	5	2	2	beige rose	taches
16	Molupe 44	érigée	deter	2	3	2	2	2	plat	oblongue	4	mojarra	circuler	2	2
17	Molupe 45	érigée	indeter.	ouvert	3	2	2	2	cylindrique	oblongue	2	droite	circuler	beige rose	3
18	Omos 47	érigée	deter	2	vert-jaune	2	3	plg total	2	oblongue	3	droite	circuler	2	2
19	Omos 48	érigée	deter	semicompact	2	2	2	3	2	3	4	3	2	2	2
20	Omos 49	2	deter	3	2	3	3	2	plat	3	4	mojarra	circuler	2	3
21	Omos 52	érigée	deter	semicompact	2	type b	grenat	taches	plat	3	2	droite	elipse	beige clair	taches
22	Omos 54	érigée	indeter.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	rein	crème	3
23	Is 10	érigée	deter	semicompact	vert-jaune	type b	2	2	plat	3	A	droite	rein	crème	taches
24	Prompex	érigée	deter	semicompact	vert-jaune	type c	grenat	taches	cylindrique	2	RG	droite	circuler	beige clair	2
25	Var. India	érigée	deter	semicompact	vert-jaune	3	grenat	taches	cylindrique	oblongue	3	droite	circuler	beige clair	2

(2) 2 critères du descripteur, (3) 3 critères du descripteur, (3) 4 critères du descripteur, (4) 4 critères du descripteur, (5) 5 critères du descripteur, (6) 6 critères du descripteur.

De la même façon **Olmos52** avec 12 descripteurs homogènes, elle se caractérise par une habitude de croissance de type érigée, un type de floraison déterminé, une insertion de branche semi-compacte, une couleur grenat de la gousse avec des taches, un profil de gousse plat, une forme de la gousse droite, une couleur de grain beige claire avec de taches.

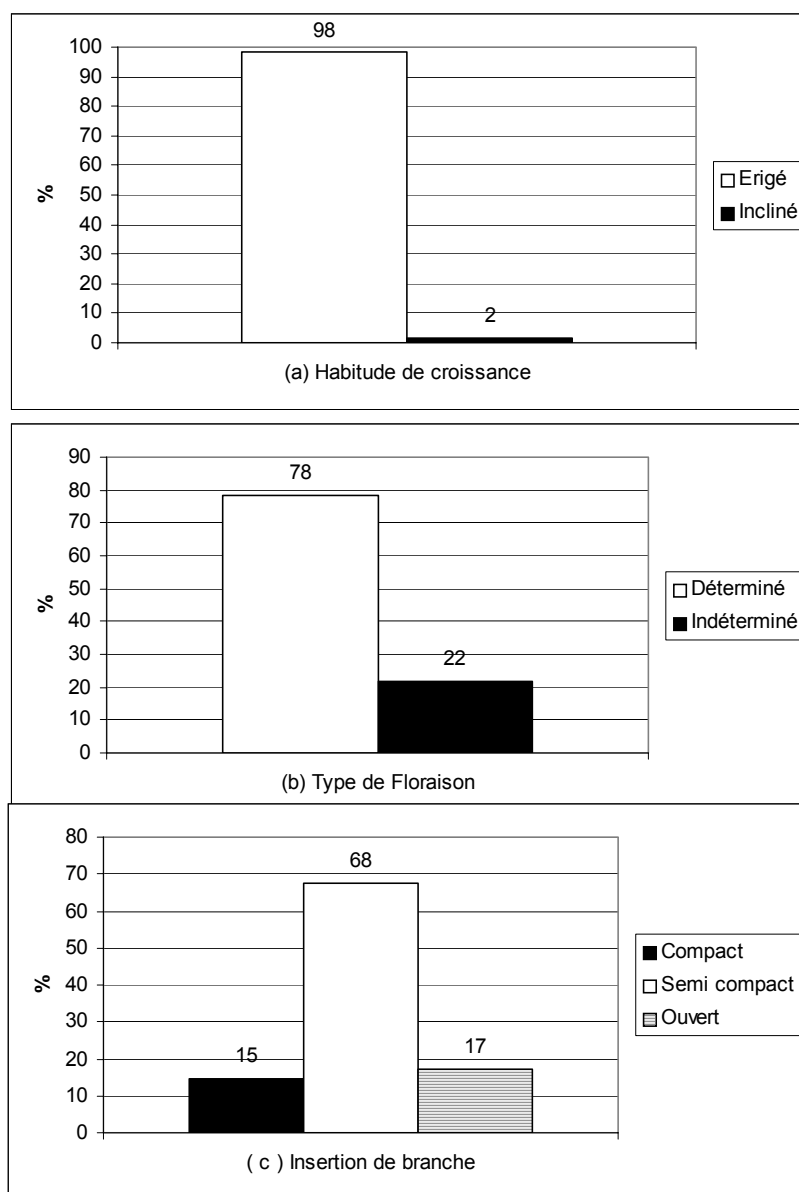
L'accession **Motupe45** se caractérise par une habitude de croissance de type érigée de type indéterminée, un type de floraison indéterminé, une insertion de branche ouverte, un profil de gousse cylindrique, une forme de folioles oblongue, une forme de la gousse droite, une forme du grain sec circulaire, une couleur de grain beige rose.

L'accession **Illimo4** se caractérise par son homogénéité sur 10 descripteurs. Elle se caractérise par une habitude de croissance de type érigée, un type de floraison déterminé, une insertion de branche semi-compacte, une pigmentation vert-jaune de la tige, une pigmentation du calice du type c, une gousse plate, une pigmentation totale, une forme *mojarra*, et une couleur du grain sec beige claire avec de taches.

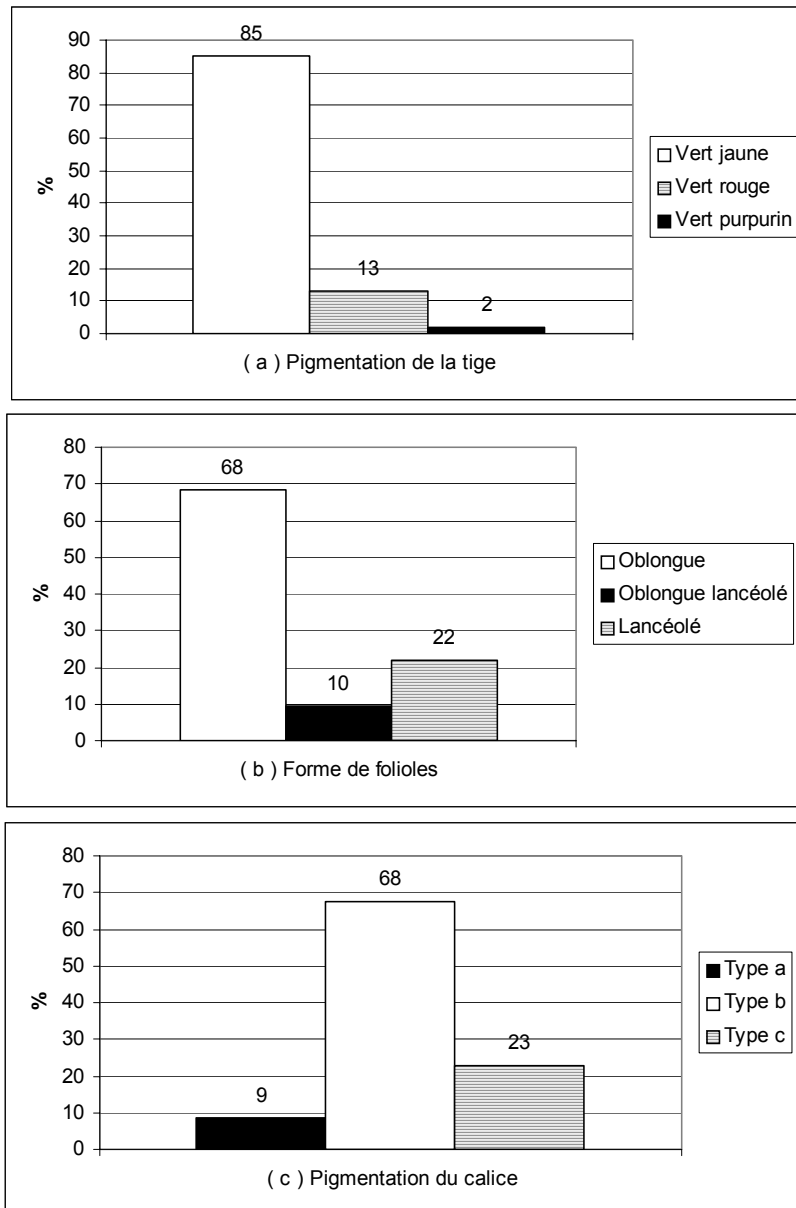
### 1.1.2 Variabilité de descripteurs qualitatifs dans l'ensemble de la collection

Les **figures du 29 à la 35** représentent graphiquement la variabilité au sein de la collection. Sur base des pourcentages et avec la taille d'échantillon de 20 plantes, pour chaque descripteur qualitatif pour 22 accessions péruviennes on peut donc affirmer que: 98% des individus des accessions péruviennes présentent le type de croissance érigé et 2% le type incliné. Les témoins ISO10, Prompex2000 et variété indienne sont tous de type érigé ((**fig 29-a**). Par rapport au type de floraison on observe que 78% des individus des accessions péruviennes sont de type déterminé et 22% de type indéterminé (**fig 29-b**). Les témoins ISO10, Prompex2000 et la variété indienne sont tous de type déterminé. 68% des individus des accessions péruviennes ont le type d'insertion de branche semi-compact, 18% sont de type ouvert et 16% de type compact. Les témoins ISO10, Prompex2000 et la variété indienne sont tous de type semi-compact. (**fig 29c**).

85% des individus des accessions péruviennes ont la pigmentation de la tige vert jaune, 13% vert rouge et 2% vert purpurin ((**fig 30-a**), alors que les témoins ISO10, Prompex2000 et variété indienne qui sont tous de type vert jaune. 68% des individus des accessions péruviennes ont la forme des folioles oblongue, 22% lancéolé et 10% oblongue-lancéolé (**fig 30-b**), alors que les témoins ISO10, Prompex2000 et variété indienne qui sont tous de type oblong. 68% des individus des accessions péruviennes ont le lobe supérieur du calice pigmenté, comme ISO10 et la variété indienne. 24% des accessions péruviennes ont le lobule supérieur et inférieur pigmenté comme Prompex2000 et 9% des accessions péruviennes n'ont pas de pigmentation (**fig 30-c**).



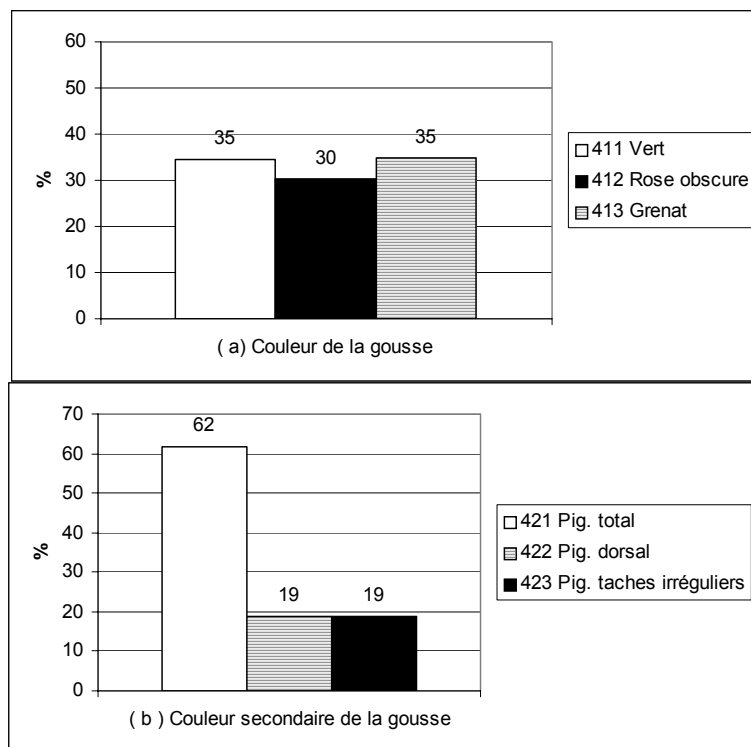
**Figure 29 :** Variabilité des accessions péruviennes exprimé en pourcentage (%) de descripteurs qualitatifs : (a) Habitude de croissance, (b) Type de Floraison, (c) Insertion de branche ; d'une collection de *pigeonpea*.



**Figure 30** : Variabilité des accessions péruviennes exprimées en pourcentage (%) de descripteurs qualitatifs : (a) pigmentation de la tige, (b) forme de folioles, (c) pigmentation du calice ; d'une collection de *pigeonpea*.

35% des individus des accessions péruviennes ont la gousse de couleur verte comme ISO10, 35% grenat, comme Prompex2000 et la variété indienne et 30% rose foncée (**fig 31-a**). 62% des individus des accessions péruviennes ont la pigmentation secondaire de la gousse mauve étendue de forme totale, comme le témoin ISO10, 20% une pigmentation dorsale et 19%

une pigmentation en forme de taches irrégulières, comme Prompex2000 et la variété indienne (**fig 31-b**).

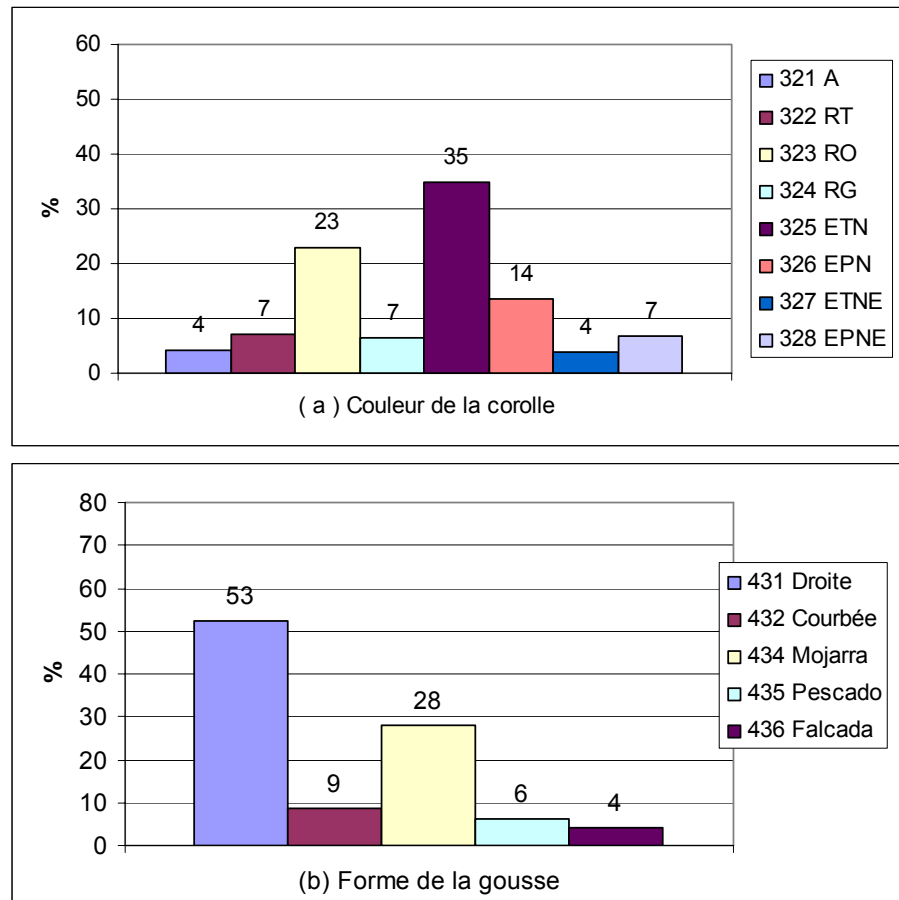


**Figure 31** : Variabilité des accessions péruviennes exprimées en pourcentage (%) de descripteurs qualitatifs : (a) couleur de la gousse, (b) couleur secondaire de la gousse; d'une collection de *pigeonpea*.

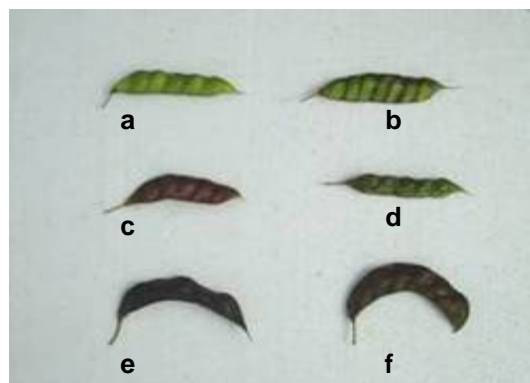
35% des individus des accessions péruviennes ont la corolle de couleur rouge tenue avec des nervures rouges (ETN) et 23% ont la corolle rose foncée avec des nervures invisibles (RO), comme la variété indienne. 14% ont la corolle rouge foncée avec des nervures rouges (EPN), 7% rouge foncée total avec tache inférieure ventrale (EPNE), 7% rose tenue avec des nervures invisibles (RT), 7% rouge glabre avec des nervures invisibles plus tache inférieure ventrale (RG), comme le témoin Prompex2000, et 4% jaune sans pigmentation secondaire (A), comme ISO10. Finalement seulement 4% sont de couleur rouge tenue total plus extension du pigment de la partie dorsale, nervure visible. (ETNE) (**fig 32-a**).

53% des individus des accessions péruviennes ont les gousses de forme droite, 28% "*mojarra*", 9% courbée, 6% en forme de poisson, et 4% "*falcada*", alors que les témoins ISO10, Prompex2000 et la variété indienne ont des gousses de forme droite (**fig 32-b et fig 33**).



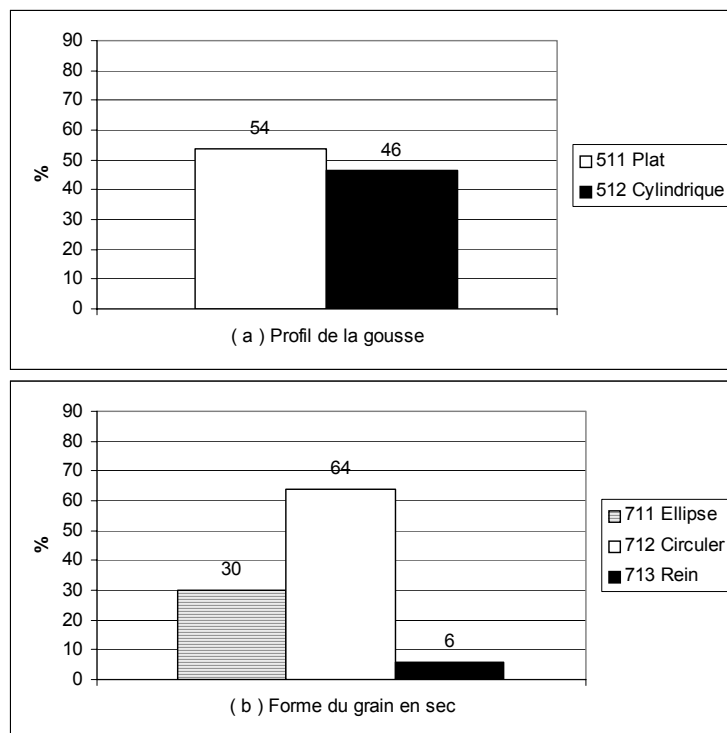


**Figure 32 :** Variabilité des accessions péruviennes exprimées en pourcentage (%) du descripteur qualitatif : (a) couleur de la corolle, (b) forme de la gousse; d'une collection de *pigeonpea*.



**Figure 33:** Variabilité observée pour la forme de la gousse : (a): droite, (b): mojarra, (c) pescado (d) pecho, (e): courbé, (f): falcada.

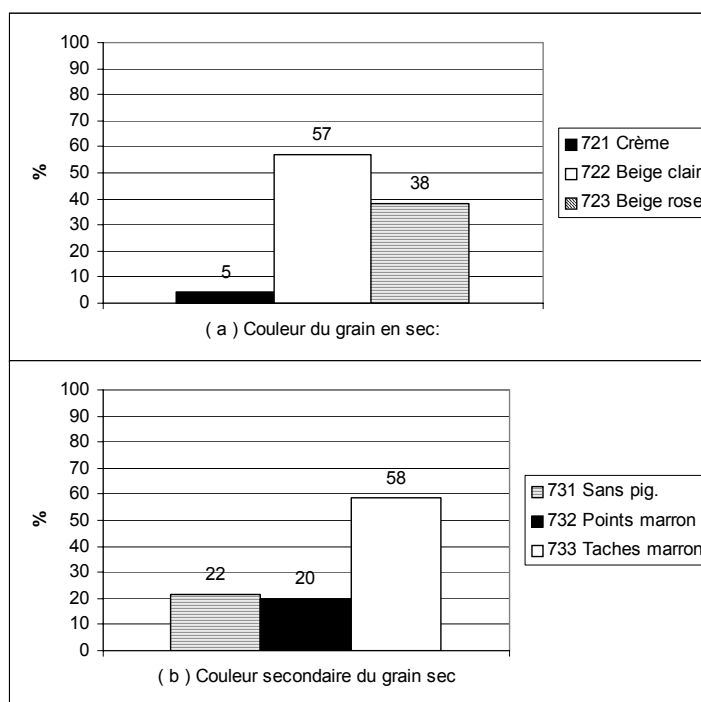
54% des individus des accessions péruviennes ont un profil de gousse plat, comme le témoin ISO10 et 46% ont un profil de gousse cylindrique, comme les témoins Prompex2000 et la variété indienne (**fig 34-a**). 65% des individus des accessions péruviennes ont le grain de forme circulaire comme Prompex2000 et la variété indienne, 30% de forme elliptique et 6% réniforme, comme le témoin ISO10 (**fig 34-b**).



**Figure 34** : Variabilité des accessions péruviennes exprimées en pourcentage (%) de descripteurs qualitatifs : (a) profil de la gousse, (b) forme du grain sec d'une collection de *pigeonpea*.

57% des individus des accessions péruviennes ont la graine de couleur beige clair, comme les témoins Prompex2000 et la variété indienne, 38% rose et 6% crème, comme le témoin ISO10 (**fig 35-a**). 58% des individus des accessions péruviennes ont une pigmentation secondaire marron en forme de taches, comme les témoins, 20% en forme de points et 22% n'ont aucune pigmentation secondaire de la graine (**fig 35-b**).

La caractérisation morphologique des accessions étudiées a mis en évidence une variabilité phénotypique importante. Parmi les 46 catégories possibles des 14 descripteurs utilisés (**tableau 13A-B**, page 75 et 76) deux catégories peuvent être considérées comme des catégories rares, elles sont observées chez une ou deux accessions seulement parmi les 25 étudiées. C'est le cas des catégories habitude de croissance érigée et pigmentation de la tige vert purpurin.



**Figure 35 :** Variabilité des accessions péruviennes exprimées en pourcentage (%) de descripteurs qualitatifs : (a) couleur du grain en sec, (b) couleur secondaire du grain sec d'une collection de *pigeonpea*.

## 1.2 Analyse factorielle des correspondances (AFC)

Nous mettrons en évidence la variabilité de la collection de *pigeonpea* sur base de 14 descripteurs morphologiques qualitatifs, à l'aide de un AFC. Cette analyse est basée sur la transformation d'un ensemble de variables originales en un autre groupe de variables indépendantes non corrélées, appelées facteurs. L'AFC concentre toute la variation de la matrice de données en plusieurs axes ou facteurs.

L'AFC est un outil précieux pour analyser les données de caractérisation et d'évaluation préliminaire de germoplasme. Celui-ci permet de connaître la relation existant entre les descripteurs utilisés et les similitudes entre les accessions. Dans le premier cas, afin de connaître quels descripteurs sont associés entre eux, lesquels caractérisent dans le même sens ou dans le sens contraire; et dans le deuxième cas afin de savoir comment les accessions sont distribuées et lesquelles sont semblables.

L'AFC permet aussi de sélectionner les descripteurs les plus discriminatoires pour limiter le nombre de descripteurs à utiliser. C'est pour cette raison que nous avons analysé les 6 descripteurs de haute variabilité génétique en *pigeonpea* selon l'étude de Verschueren (1992) (FF, CCO, FG,

FGS, CGS et CSGr) et 14 descripteurs au total (HC, TF, IB, PT, FF, PCA, CCO, CG, CSGO, FG, PG, FGS, CGS et CSGr).

L'analyse a été faite en utilisant la moyenne d'un échantillon de 20 plantes et un de 5 plantes (*phytoPASS*). Les valeurs moyennes sont reprises dans les **annexes 1-4** (pages 221-224).

### 1.2.1 Sur base d'un échantillon de 20 plantes et 14 descripteurs

En utilisant 14 descripteurs pour l'AFC le premier facteur F1 explique 22% de la variabilité et le deuxième F2 16%. Ce qui nous donne une variabilité cumulée de 38% (moins que en utilisant seulement 6 descripteurs).

Les coefficients des facteurs des 14 descripteurs qualitatifs étudiés montrent qu'une haute structuration du premier facteur F1 est définie négativement par la pigmentation du calice (PCA), la couleur de la gousse (CG), la couleur secondaire de la gousse (CSGO) et la couleur secondaire du grain sec (CSGr). Le deuxième facteur F2 est défini négativement par l'insertion des branches (IB), la forme de la gousse (FG) et positivement par la forme de foliole (FF) et le profil de la gousse (PG) (**tableau 22**).

**Tableau 22** : Coefficients des facteurs des descripteurs qualitatifs (20 plantes, 14 descripteurs).

Descripteurs	sigle	F1	F2
Habitude de croissance	HC	0,122	-0,170
Type de floraison	TF	0,184	0,001
Insertion des branches	IB	0,093	<b>-0,210</b>
Pigmentation de la tige	PT	0,165	-0,059
Forme de folioles	FF	0,080	<b>0,204</b>
Pigmentation du calice	PCA	<b>-0,201</b>	0,016
Couleur de la corolle	CCO	-0,008	-0,148
Couleur de la gousse	CG	<b>-0,274</b>	-0,076
Couleur secondaire de la gousse	CSGO	<b>-0,205</b>	-0,018
Forme de la gousse	FG	0,057	<b>-0,374</b>
Profil de la gousse	PG	-0,003	<b>0,380</b>
Forme du grain sec	FGS	0,102	-0,115
Couleur du grain sec	CGS	-0,028	0,044
Couleur secondaire du grain sec	CSGr	<b>-0,243</b>	-0,141

La projection des descripteurs évalués sur les deux axes des facteurs (**figure 36**, page 105) montre la proximité des caractères suivants : la pigmentation du calice (PCA), la couleur de la gousse (CG), la couleur secondaire de la gousse (CSGO) et la couleur secondaire du grain sec (CSGr) qui définissent l'axe F1, ce qui a été démontré dans le **tableau 22**.

La projection de 25 accessions sur le plan formé par les deux axes de l'AFC montre une variabilité au sein des accessions évaluées. Celle-ci est démontrée par la dispersion du nuage de points représentant les accessions (**figure 38**, page 106).

La variété améliorée Prompex2000 et la variété indienne sont proches entre elles et s'éloignent des accessions péruviennes mais pas des

accessions Jayanca26, Illimo1 et, Illimo2, et Olmos52. Ces dernières accessions se caractérisent par une gousse de forme droite et profil cylindrique et une pigmentation secondaire de la gousse en forme de taches (en prenant en compte les descripteurs utilisés dans cette analyse).

### 1.2.2 Sur base d'un échantillon de 5 plantes (phytoPASS) et 14 descripteurs

En utilisant 14 descripteurs pour l'AFC, le premier facteur F1 explique 26% de la variabilité et le deuxième 17%. Ce qui nous donne une variabilité cumulée de 43% (moins qu'en utilisant seulement 6 descripteurs).

Les coefficients des facteurs des 14 descripteurs qualitatifs étudiés et les deux premiers facteurs (**tableau 23**) montrent qu'une haute structuration du premier facteur F1 est définie positivement par la forme de folioles (FF) et la pigmentation du calice (PCA).

Le deuxième facteur F2 est défini par une corrélation élevée avec la pigmentation de la tige (PT), la couleur de la gousse (CG), la couleur secondaire de la gousse (CSGo), et la couleur secondaire de la graine (CSGr).

Les 14 caractères morphologiques pris en considération dans l'AFC contribuent d'une manière différente à la variabilité expliquée par les 2 axes. La projection des descripteurs évalués sur les deux axes de facteurs (**figure 37**, page 105) montre un rapprochement de la couleur secondaire de la gousse (CSGo) et la couleur de la gousse (CG), qui définissent l'axe F1 avec la couleur secondaire du grain sec (CSGr) et la pigmentation de la tige (PT). On observe aussi une proximité des caractères PCA et FF qui définissent l'axe F2, ce qui confirme ce que nous avons montré dans le **tableau 23**.

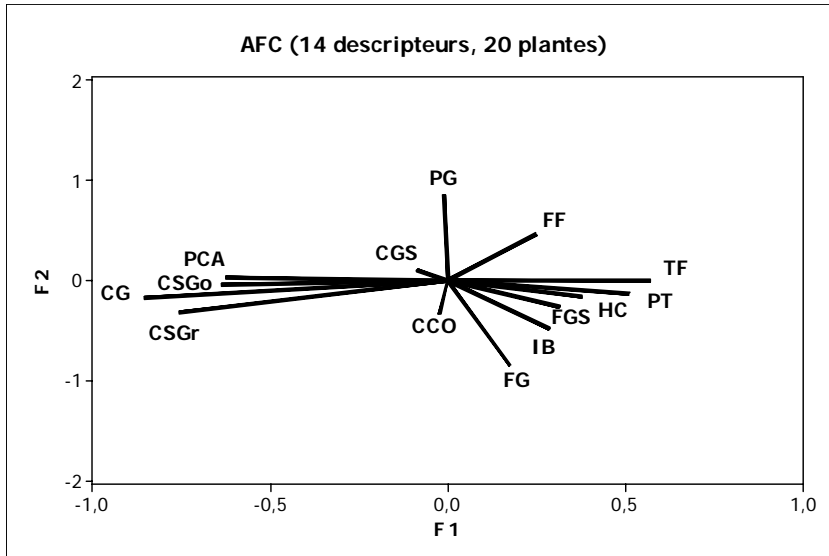
**Tableau 23** : Coefficients des facteurs des descripteurs qualitatifs (5 plantes-phytoPASS et 14 descripteurs).

Descripteurs	variable	F1	F2
Habitude de croissance	HC	-0,076	-0,108
Type de floraison	TF	-0,028	-0,213
Insertion de branche	IB	-0,067	-0,133
Pigmentation de la tige	PT	0,189	<b>-0,248</b>
Forme de folioles	FF	<b>0,217</b>	-0,148
Pigmentation du calice	PCA	<b>0,227</b>	-0,069
Couleur de la corolle	CCO	0,113	-0,048
Couleur de la gousse	CG	0,159	<b>0,240</b>
Couleur secondaire de la gousse	CSGo	0,148	<b>0,231</b>
Forme de la gousse	FG	-0,104	-0,073
Profil de la gousse	PG	0,121	-0,008
Forme du grain sec	FGS	-0,190	-0,072
Couleur du grain sec	CGS	0,007	0,115
Couleur secondaire du grain sec	CSGr	-0,053	<b>0,323</b>

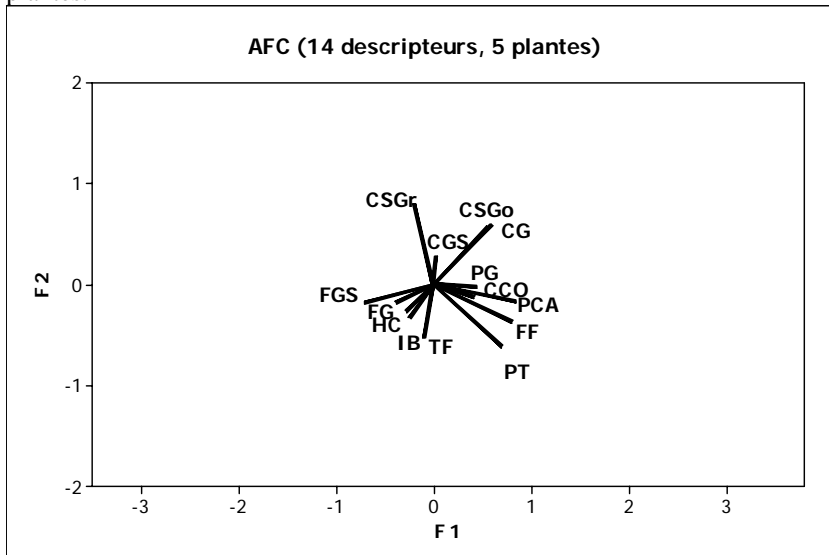
La projection de 25 accessions sur le plan formé par les deux axes de l'AFC montre une variabilité au sein des accessions évaluées, celle-ci est démontrée par la dispersion du nuage de points représentant les accessions (**figure 39**, page 106).

La variété améliorée Prompex2000 et la variété indienne sont proches entre elles et s'éloignent des accessions péruviennes sauf des accessions Jayanca26 et Olmos52. Ces accessions se caractérisent par une coloration mauve grenat des gousses avec des taches irrégulières.

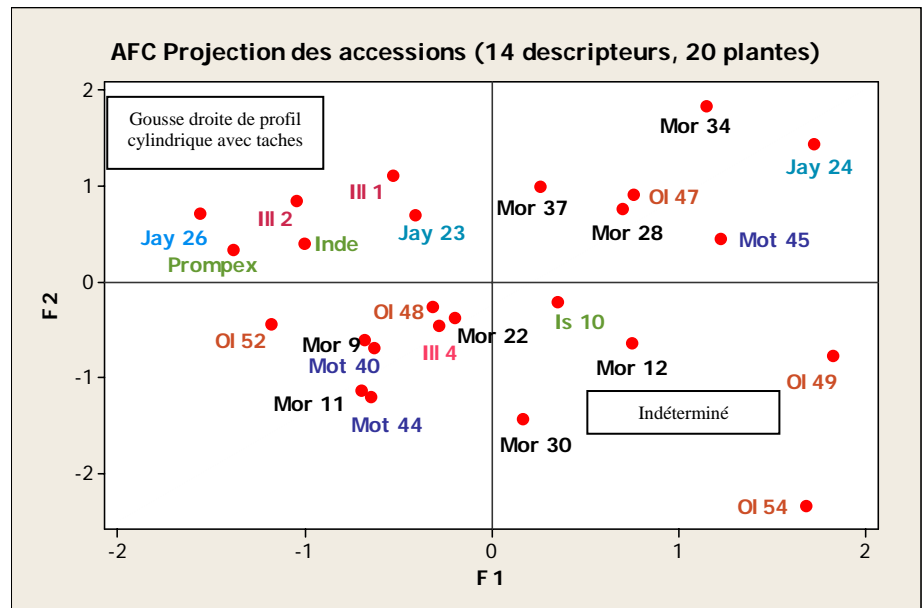
Un autre groupe d'accessions (Olmos54, Olmos49, Motupe45, Jayanca24 et Morrope34) de gousses vertes sans pigmentation secondaire se situe écarté du reste des accessions.



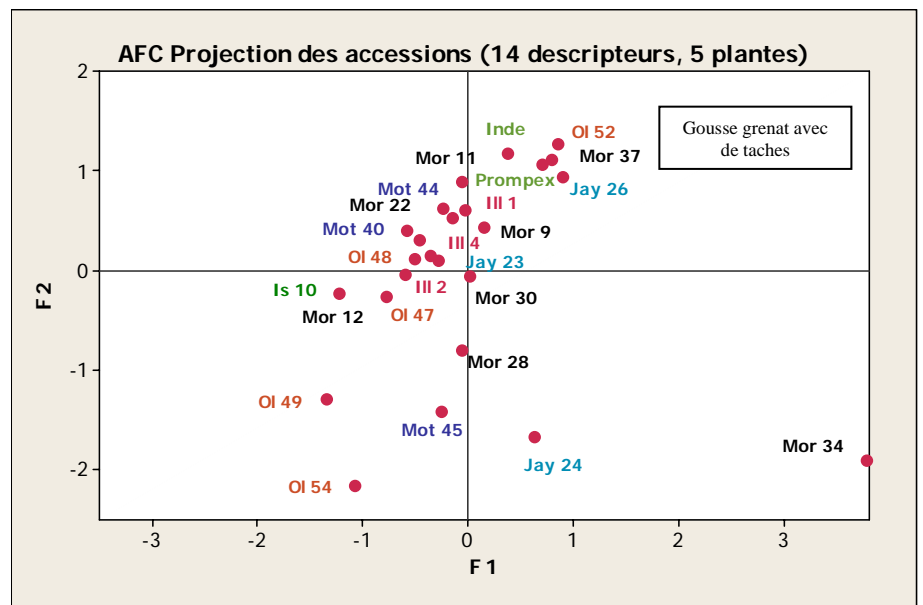
**Figure 36 :** Projection des 14 descripteurs qualitatifs sur les deux premiers axes de l'AFC expliquant le 38% de la variabilité totale, sur base d'un échantillon de 20 plantes.



**Figure 37 :** Projection des 14 descripteurs qualitatifs sur les deux premiers axes de l'AFC expliquant le 43% de la variabilité totale, sur base d'un échantillon de 5 plantes – *phytoPASS*.



**Figure 38** : Projection de 25 accessions de *pigeonpea* sur le plan formé par les deux axes de l'AFC de 2 facteurs avec 14 descripteurs qualitatifs et 20 plantes.



**Figure 39** : Projection de 25 accessions de *pigeonpea* sur le plan formé par les deux axes de l'AFC de 2 facteurs avec 14 descripteurs qualitatifs et 5 plantes-*phytoPASS*.

### 1.2.3 Sur base d'un échantillon de 20 plantes et 6 descripteurs

En utilisant 6 descripteurs pour l'AFC, le premier facteur F1 explique 23% de la variabilité et le deuxième F2, 21% de la variabilité. Ce qui nous donne une variabilité cumulée de 44%

Les coefficients des facteurs des 6 descripteurs qualitatifs étudiés (**tableau 24**) montrent une haute structuration de la première composante F1 définie positivement par les caractères morphologiques : forme de la gousse (**FG**) et forme du grain sec (**FGS**). Le deuxième facteur F2 est défini par les descripteurs de la forme de folioles (**FF**), la couleur de la corolle (**CCO**) et la couleur de grain sec (**CGS**),

**Tableau 24** : Coefficients des facteurs des descripteurs qualitatifs (20 plantes, 6 descripteurs).

Descripteurs	sigle	F1	F2
Forme de folioles	FF	-0,178	<b>0,426</b>
Couleur de la corolle	CCO	0,346	<b>0,544</b>
Forme de la gousse	FG	<b>0,523</b>	0,070
Forme du grain sec	FGS	<b>0,369</b>	0,117
Couleur du grain sec	CGS	-0,208	<b>0,386</b>
Couleur secondaire du grain sec	CSGr	0,316	- 0,355

La projection des descripteurs évalués sur les deux axes de facteurs (**figure 40**, page 109) montre d'abord une proximité entre les descripteurs : forme de la gousse (**FG**) et forme du grain sec (**FGS**), qui définissent l'axe F1. On observe aussi une proximité des caractères : couleur du grain sec (**CGS**) et forme de folioles (**FF**) qui définissent l'axe F2 avec la couleur de la corolle (**CCO**), ce qui confirme ce que nous avons montré dans le **tableau 24**.

La projection de 25 accessions sur le plan formé par les deux axes de l'AFC montre une variabilité au sein des accessions évaluées. Celle-ci est démontrée par la dispersion du nuage de points représentant les accessions (**figure 42**, page 110).

On observe l'accession Olmos54 éloigné du reste des accessions et à droite du graphique que se caractérise pour être de type indéterminé des grains réniformes crème. On observe que la variété Prompex2000 et la variété indienne sont proches entre elles.

### 1.2.4 Sur base d'un échantillon de 5 plantes (phytoPAS S) et 6 descripteurs

Dans notre étude, le premier facteur F1 explique 33% de la variabilité et le deuxième 22% de la variabilité. Ce qui nous donne une variabilité cumulée de 55%.

Les coefficients des facteurs des 6 descripteurs qualitatifs (**tableau 25**), montrent qu'une haute structuration du premier facteur F1 est définie positivement par la forme de folioles (**FF**) et négativement par la forme du grain sec (**FGS**). Le deuxième facteur F2 est défini par une corrélation



négative avec les caractères couleur de la corolle (cco) et la forme de la gousse (FG).

**Tableau 25** : Coefficients des facteurs de descripteurs qualitatifs (5 plantes-*phytoPASS*).

Descripteurs	sigle	F1	F2
Forme de folioles	FF	<b>0,354</b>	0,221
Couleur de la corolle	CCO	0,331	<b>-0,418</b>
Forme de la gousse	FG	-0,007	<b>-0,642</b>
Forme du grain sec	FGS	<b>-0,394</b>	-0,153
Couleur du grain sec	CGS	0,177	-0,309
Couleur secondaire du grain sec	CSGr	-0,267	-0,018

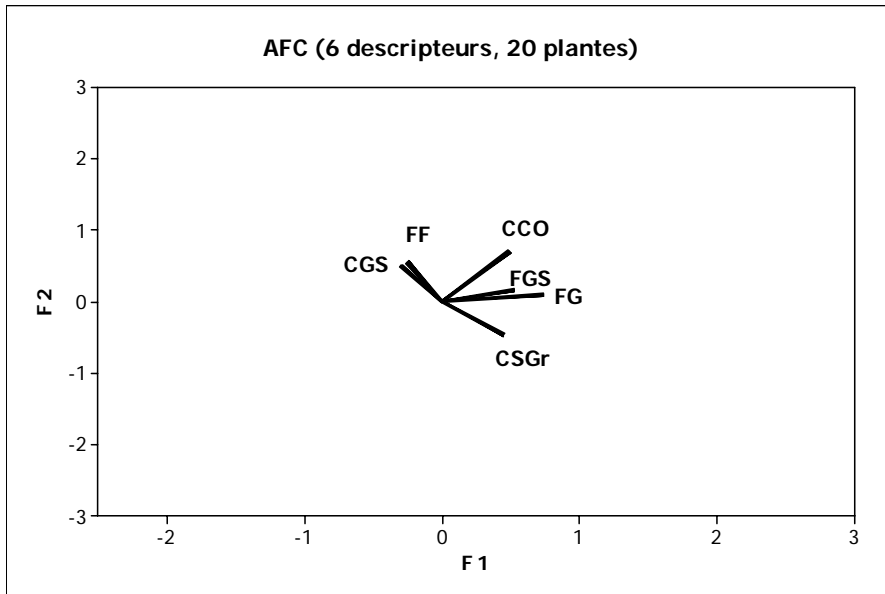
La projection des descripteurs évalués sur les deux axes de l'AFC (**figure 41**, page 109), montre une corrélation négative entre forme de folioles (FF) et forme du grain sec (FGS) qui définit l'axe F1.

La projection de 25 accessions sur le plan formé par les deux axes de l'AFC, montre une variabilité au sein des accessions évaluées. La dispersion du nuage de points représentant les accessions en est la preuve (**figure 43**, page 110).

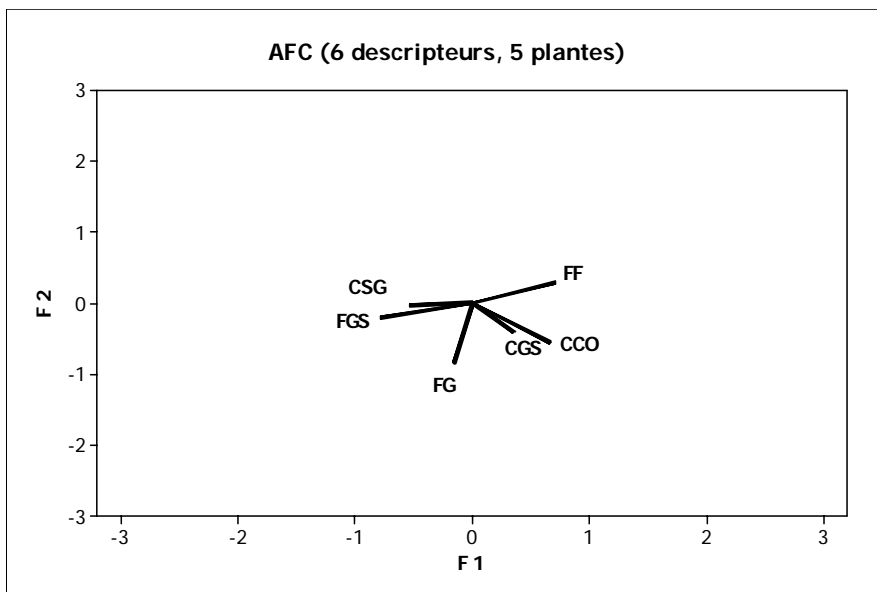
On remarque que les variétés améliorées Prompex2000 et la variété indienne sont proches entre elles.

Les accessions Morrope34 et Olmos54 s'éloignent du groupe des accessions péruviennes. Un autre groupe d'accessions avec la forme "*mojarra*" de la gousse se trouve dans la partie inférieure du graphique du plan des facteurs (Morrope30 et Motupe44).

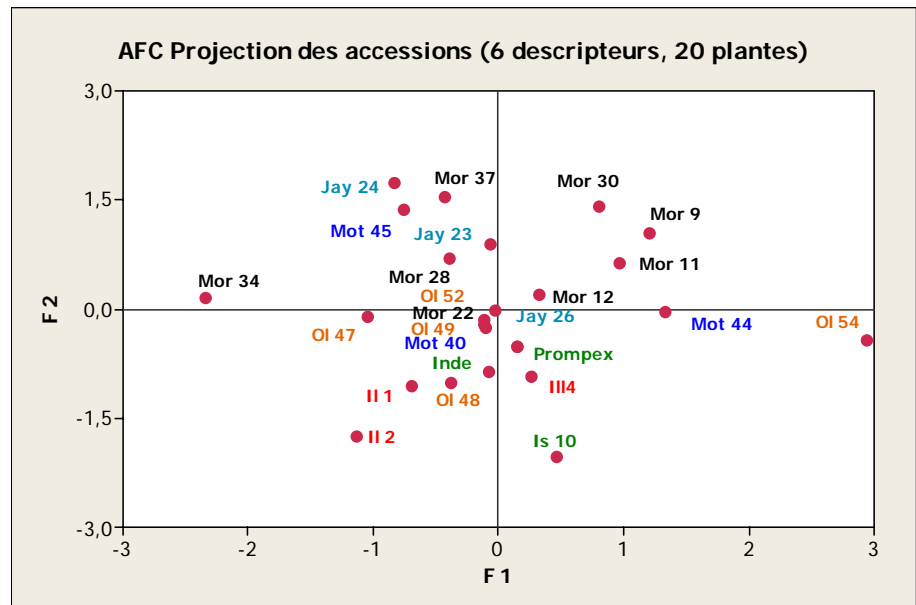
Les résultats semblent être contradictoires quand on utilise un nombre différent de descripteurs. Le groupe de descripteurs qui détermine les axes de l'AFC sont différents quand 14 ou 6 descripteurs sont utilisés. On retrouve également des résultats différents lorsqu'on utilise un échantillon de 20 ou 5 individus. Même si la variabilité est plus élevée quand la taille de l'échantillon est plus petite, il pourrait s'agir d'une surestimation de la variabilité. On observe aussi des convergences entre les différents AFC, dues aux descripteurs qui interviennent dans la définition des axes : FF, PCA, CG, CSGO et CSGr.



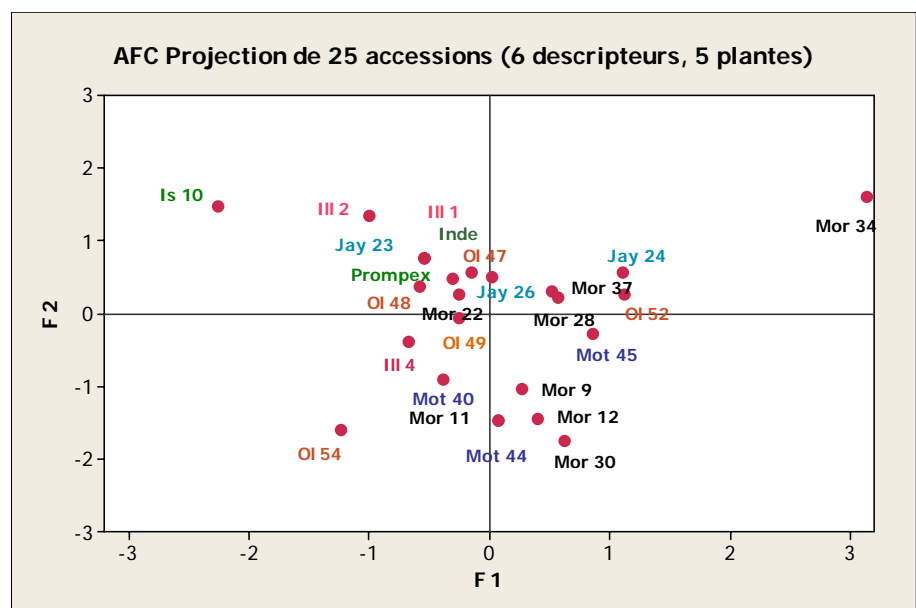
**Figure 40 :** Projection des descripteurs qualitatifs sur les deux premiers axes de l'AFC expliquant le 44% de la variabilité totale, sur base d'un échantillon de 20 plantes.



**Figure 41 :** Projection des 6 descripteurs qualitatifs sur les deux premiers axes de l'AFC expliquant 55% de la variabilité totale, sur base d'un échantillon de 5 plantes-*phytoPASS*.



**Figure 42** : Projection de 25 accessions de *pigeonpea* sur le plan formé par les deux axes de l'AFC de 2 facteurs avec 6 descripteurs qualitatifs et 20 plantes.



**Figure 43** : Projection de 25 accessions de *pigeonpea* sur le plan formé par les deux axes de l'AFC de 2 facteurs avec 6 descripteurs qualitatifs et 5 plantes-*phytoPASS*.

## 2. Caractérisation quantitative

Dans cette partie, nous présenterons la caractérisation de la collection, en premier lieu à l'aide des descripteurs quantitatifs morphologiques, et en suite à l'aide de descripteurs quantitatifs agronomiques.

### 2.1 Descripteurs quantitatifs morphologiques

La caractérisation morphologique a été faite sur base des descripteurs présentés dans le **tableau 14** (page 77). Les résultats de cette caractérisation ont été repris dans le **tableau 26** (moyennes de 20 plantes) de la page 112. De la même façon la caractérisation sur base des plantes qu'on servi pour l'analyse moléculaire (5 plantes *phytoPASS*) a été réalisée, et il est présenté dans le **tableau 27** (page 113).

#### 2.2.1 Variabilité phénotypique

D'après l'analyse ANOVA, la plupart des caractéristiques sont statistiquement hautement significatives (**tableau 28**). Les valeurs de : CV%, les valeurs moyennes et le rang de valeur des caractères quantitatifs évalués, décrits dans le même tableau, nous donnent une idée de la variabilité du germoplasme caractérisé. Dans certains cas la variabilité est très haute exprimé par le CV% (coefficient de variabilité).

Le germoplasme montre une haute variabilité pour : nombre de branches secondaires (46,6%), nombre de grappes (32,9%), la hauteur de plante (17%), diamètre de la tige (16,4%), longueur de l'axe floral (14,9 %) et nombre de branches primaires (14,5%).

**Tableau 28** : Variabilité des descripteurs morphologiques quantitatifs évalués : coefficient de variabilité (CV%), moyenne, gamme de valeurs (maximum et minimum) et signification statistique

Descripteurs	Sig	Unités	CV%	Moyenne	Maximum	Minimum	Signification ( $p=0,01$ )
Hauteur de la plante	HP	cm	17	127,9	238,5	54,5	**
Diamètre de la tige	DT	cm	16	1,8	2,8	0,9	**
Nombre de branches primaires par plante	BP	unités	14	14,8	21,3	9,7	**
Nombre de branches secondaires par plante	BS	unités	46	9,7	28,1	0,1	**
Nombre de grappes	NG	unités	32	171,6	233,5	68,7	**
Longueur de l'axe floral	LAF	cm	14	2,5	3,9	1,2	**
Longueur de la gousse	LoG	cm	5,7	7,8	9,7	6,5	**
Largeur de la gousse	LaG	cm	4,0	1,5	2,0	1,2	*

\*\* statistiquement hautement significative

\* statistiquement significative

ns statistiquement non significative

**Tableau 26 :** Caractérisation de la collection. Descripteurs agro-morphologiques quantitatifs (20 plantes).

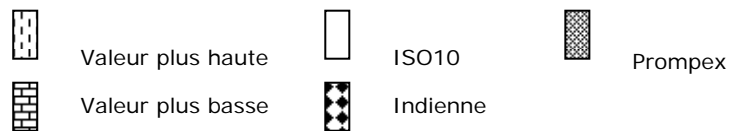
N	Accession	HP	DT	BP	BS	NG	LAF	LoG	LaG	JF	MF	%GS1	RTV	NGo/P	P 100G	NGr/G	RGS1	RGS2	RGST
1	Illimo 1	83,5	1,3	16,5	6,3	125,0	2,0	8,0	1,4	120,4	194,6	60,8	280,2	122,6	19,9	4,6	48,3	31,5	79,8
2	Illimo2	92,5	1,4	14,7	1,8	158,0	2,1	7,4	1,5	118,9	201,0	59,5	305,2	161,3	17,5	4,6	66,9	45,5	112,3
3	Illimo4	76,3	1,5	15,8	2,9	180,9	1,9	7,1	1,7	127,7	210,7	53,2	301,4	175,6	17,4	4,6	61,2	53,5	114,6
4	Morrope 9	135,6	1,9	15,8	7,5	219,2	2,8	7,1	1,4	150,0	229,5	54,7	377,5	235,8	17,1	3,5	58,6	46,3	104,8
5	Morrope 11	115,1	1,6	21,3	19,4	199,0	3,0	6,5	1,8	169,8	244,8	57,0	417,9	193,4	16,9	4,5	69,8	49,5	119,2
6	Morrope 12	141,0	2,0	16,7	13,1	221,0	2,9	6,8	1,6	199,2	277,8	61,2	671,8	289,8	15,2	4,5	98,5	59,0	157,4
7	Morrope 22	124,0	2,0	14,0	9,9	101,8	3,0	8,4	1,6	172,3	250,5	63,4	471,5	178,4	19,3	5,0	86,0	49,6	135,5
8	Javanca 23	121,0	1,9	11,8	7,9	184,4	2,0	7,0	1,4	146,2	224,4	63,9	485,8	255,6	15,2	4,9	85,4	46,3	131,6
9	Javanca 24	155,6	2,0	18,9	19,1	196,6	3,9	7,6	1,5	180,5	254,7	67,8	660,8	285,5	18,6	4,7	120,4	55,9	176,4
10	Javanca 26	54,6	0,9	9,7	0,3	68,7	1,6	7,7	1,2	105,6	180,7	57,7	157,6	88,1	17,3	4,5	33,8	25,1	58,9
11	Morrope 28	129,1	2,0	16,5	27,1	175,0	3,3	9,4	1,4	164,7	244,0	53,5	476,3	222,4	18,9	4,6	82,3	69,3	151,6
12	Morrope 30	194,9	2,6	16,6	28,1	166,5	3,2	7,7	2,0	241,3	321,3	65,4	551,8	250,5	15,5	5,0	106,4	55,8	162,1
13	Morrope 34	148,1	2,2	11,2	9,8	233,5	2,5	8,2	1,5	179,0	260,6	58,3	617,8	256,3	17,0	5,1	95,3	68,2	163,5
14	Morrope 37	159,0	2,1	15,1	15,5	226,9	2,7	8,0	1,5	154,5	229,9	57,0	580,0	252,7	16,5	5,1	95,1	71,4	166,4
15	Motupe 40	102,8	1,5	13,9	6,3	195,6	2,1	7,2	1,6	130,6	209,2	62,1	360,4	172,3	19,0	4,2	69,4	39,8	109,1
16	Motupe 44	158,5	2,5	14,1	14,0	226,9	2,9	7,9	1,7	170,1	248,2	61,5	865,9	325,4	18,1	5,0	132,4	77,1	209,5
17	Motupe 45	238,5	2,8	20,5	14,1	179,8	3,6	7,2	1,3	259,5	334,4	60,7	446,6	246,2	14,9	4,8	86,5	56,2	142,7
18	Olmos 47	120,9	2,0	14,5	15,8	170,2	2,3	8,3	1,5	141,2	222,7	56,6	449,4	214,2	17,5	4,6	71,6	56,3	127,8
19	Olmos 48	112,3	1,7	14,0	4,7	156,6	2,3	8,0	1,5	137,8	221,8	61,7	476,9	171,6	20,8	4,8	80,0	49,9	129,8
20	Olmos 49	133,2	1,8	14,8	4,5	204,5	1,9	7,4	2,0	137,3	218,0	59,8	458,6	187,4	18,7	4,0	63,8	42,4	106,2
21	Olmos 52	133,9	1,8	12,7	2,5	143,5	3,2	8,0	1,5	143,3	221,3	64,5	581,8	254,9	17,9	5,2	109,4	60,5	169,9
22	Olmos 54	193,3	2,6	13,5	8,6	230,4	2,5	7,9	1,5	164,6	246,4	61,9	839,1	298,2	19,6	5,3	141,4	86,8	228,2
23	Iso 10	133,2	1,4	13,1	0,1	107,2	1,2	8,4	1,6	131,3	207,6	65,3	469,8	191,8	23,2	4,7	101,4	54,2	155,6
24	Promptex	76,1	1,2	13,1	1,5	138,7	2,0	7,9	1,3	88,8	167,7	50,8	265,0	117,4	21,0	4,9	41,1	40,3	81,3
25	Var indienne	64,7	1,2	12,9	1,4	80,4	2,7	9,7	1,2	70,7	146,0	53,9	245,7	121,7	18,3	5,5	53,0	45,0	98,0

**Tableau 27 :** Caractérisation de la collection. Descripteurs agro-morphologiques quantitatifs (5 plantes-*phytoPASS*).

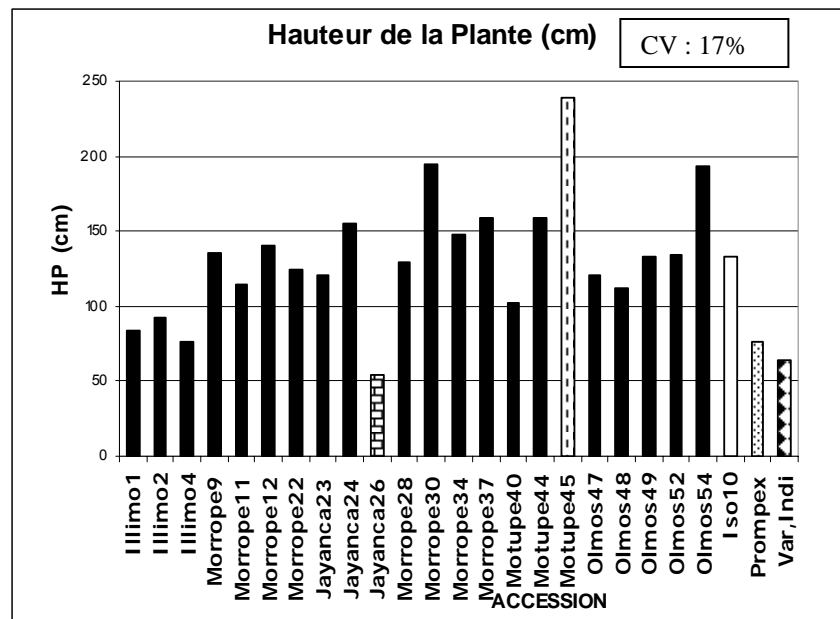
N°	Accession	HP	DT	BP	BS	NG	LAF	LoG	LaG	JF	MF	%GS1	NGo/P	P100G	NGr/G	RGS1	RGS2	RGST
1	Illimo 1	67,0	1,0	13,8	4,4	96,6	2,2	7,5	1,3	117,6	186,6	61,7	95,4	20,4	4,7	36,8	22,9	59,6
2	Illimo2	88,4	1,3	16,6	1,4	165,4	1,9	7,4	1,5	108,0	192,6	57,8	157,4	16,7	4,6	62,0	45,3	107,3
3	Illimo4	64,4	1,3	16,8	4,6	183,6	2,3	7,0	1,7	105,0	186,0	51,0	170,6	16,9	4,4	57,3	55,1	112,4
4	Morrope 9	111,2	1,2	17,2	5,8	149,8	2,7	6,2	1,4	139,0	213,6	50,6	171,8	16,9	2,9	32,4	31,6	64,0
5	Morrope 11	108,2	1,4	21,0	16,6	145,8	2,7	6,3	1,7	167,4	239,2	54,5	179,6	17,3	4,4	60,8	50,8	111,5
6	Morrope 12	110,6	1,7	19,2	18,6	118,8	2,9	6,5	1,8	187,4	263,6	56,9	242,8	16,1	4,0	66,5	50,3	116,8
7	Morrope 22	105,6	1,7	16,2	10,2	85,6	2,9	8,5	1,6	162,0	235,2	64,6	143,6	20,5	4,7	62,3	34,1	96,4
8	Jayanca 23	84,6	1,4	12,4	15,0	172,4	1,8	7,0	1,4	115,6	196,6	55,8	167,4	15,9	4,7	55,4	43,8	99,2
9	Jayanca 24	120,6	1,6	18,6	20,2	115,2	3,3	7,2	1,6	179,2	249,8	63,9	184,6	18,4	4,4	66,8	37,6	104,5
10	Jayanca 26	51,8	0,7	8,6	1,0	68,8	1,9	7,8	1,2	86,4	160,2	63,7	78,2	15,7	4,8	33,0	18,8	51,8
11	Morrope 28	94,6	1,4	15,6	29,2	165,0	2,4	8,8	1,5	146,6	223,2	51,0	168,8	19,7	4,1	56,3	54,1	110,4
12	Morrope 30	144,6	2,0	15,8	22,6	71,6	2,3	7,4	2,0	227,4	300,8	57,4	212,2	15,5	4,9	75,0	55,6	130,6
13	Morrope 34	129,8	1,9	11,4	14,0	190,8	1,9	7,8	1,5	164,2	249,2	54,3	285,4	17,0	4,8	101,9	85,6	187,6
14	Morrope 37	123,2	1,6	14,0	20,6	192,0	2,2	7,2	1,5	159,2	231,2	55,2	193,0	16,0	4,7	64,3	52,1	116,4
15	Motupe 40	79,6	1,1	13,0	9,2	155,0	1,7	6,5	1,6	135,8	212,6	58,1	137,4	18,0	3,7	42,1	30,4	72,5
16	Motupe 44	105,4	1,5	15,6	8,2	121,6	2,7	7,5	1,8	143,6	218,2	65,7	168,4	19,2	4,7	78,1	40,9	118,9
17	Motupe 45	233,6	2,8	20,6	15,2	148,0	3,7	7,5	1,4	259,2	330,4	61,2	257,6	15,2	5,1	98,8	62,6	161,4
18	Olmos 47	114,4	1,6	14,2	12,4	175,8	2,3	7,7	1,5	137,0	220,2	62,1	184,0	17,4	4,2	64,8	39,6	104,4
19	Olmos 48	116,4	1,6	12,6	8,6	148,0	2,1	8,5	1,6	137,8	218,2	56,4	217,6	21,5	4,8	92,8	71,7	164,5
20	Olmos 49	102,0	1,1	12,4	3,4	110,6	1,8	7,1	1,9	137,2	218,8	54,5	155,0	17,8	3,4	38,4	32,0	70,4
21	Olmos 52	116,2	1,5	15,6	3,2	163,6	2,7	8,3	1,5	125,6	202,8	60,5	215,2	18,1	5,2	86,2	56,2	142,4
22	Olmos 54	195,8	2,2	15,0	10,0	170,0	2,7	8,3	1,6	170,4	251,2	60,2	307,6	20,6	5,5	150,8	99,8	250,7
23	Iso 10	135,8	1,4	15,8	0,0	136,4	1,2	8,2	1,6	120,0	196,0	66,8	237,4	23,2	4,8	127,4	63,2	190,6
24	Prompex	78,8	1,2	13,0	2,6	140,2	1,9	8,1	1,3	84,2	164,2	44,3	130,2	20,2	4,8	35,4	44,5	79,9
25	Var Indienne	65,0	1,0	12,4	0,0	69,0	2,7	9,8	1,2	64,0	138,8	54,2	138,2	17,7	5,3	61,3	51,9	113,2

### 2.2.2 Comparaison des moyennes

Nous avons élaboré un graphique sur base d'une moyenne de 20 plantes par accession pour chaque descripteur (graphiques de 44 à 50). Les accessions qui ont la plus haute et la plus basse valeur de descripteur ont été montrées. Les valeurs propres à chaque témoin sont indiquées dans les histogrammes (voir légende ci-dessous).

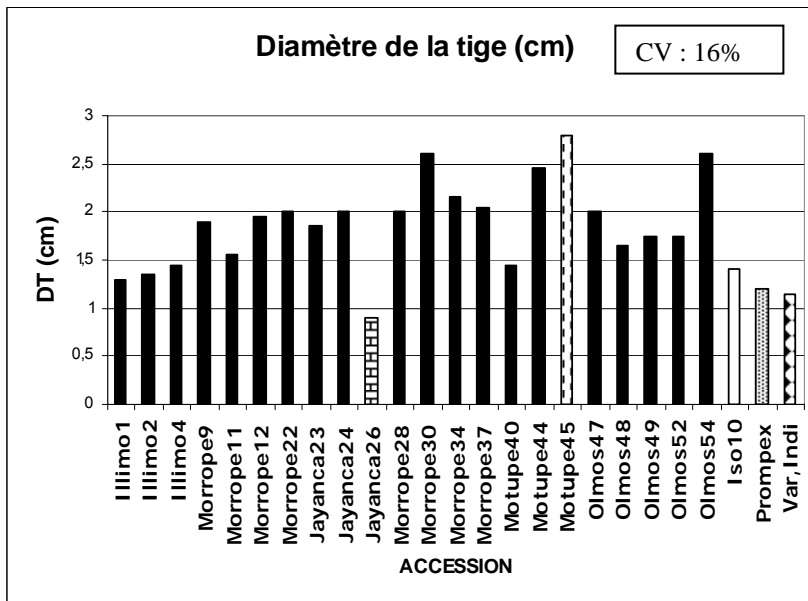


Pour les descripteurs morphologiques : taille de la plante (cm) et diamètre de la tige (cm) (**figure 44** et **figure 45**) l'accession Motupe45 (238,5 et 2,8 cm) présente la plus haute taille et le plus gros diamètre de la tige. La accession Jayanca26 (54,6 et 0,9 cm) présente la plus petite taille et le plus petit diamètre, même plus petit que les témoins Prompex2000 (76 et 1,2cm) et ISO10 (133 et 1,4 cm).

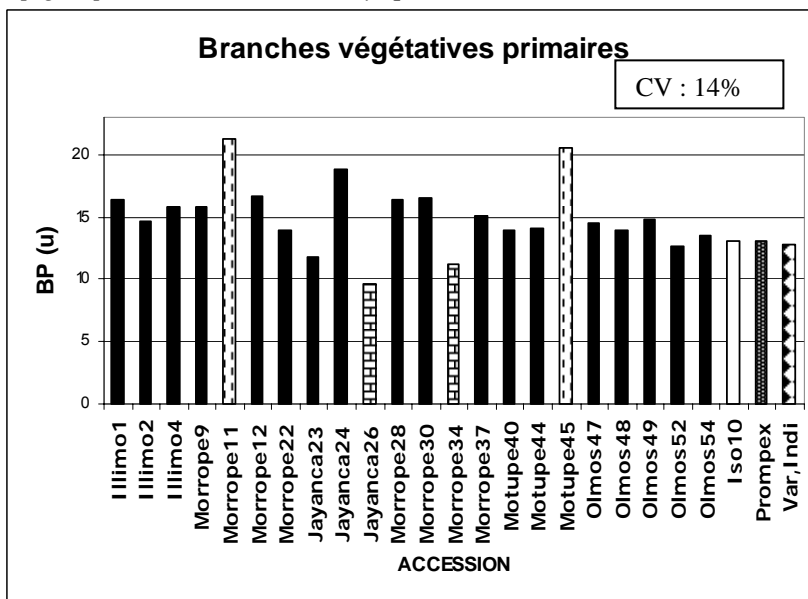


**Figure 44** : Comparaison des moyennes de la hauteur de plante (cm) d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Pour la caractéristique du nombre de branches primaires (**figure 46**), les accessions Morrope11 (21,3) et Motupe45 (20,5) présentent le plus grand nombre de branches. Les accessions Jayanca26 (9,7) et Morrope34 (11,2) présentent moins de branches, encore moins que les témoins ISO10 et Prompex2000 (13,1), et la variété indienne (12,9).



**Figure 45 :** Comparaison des moyennes du diamètre de la tige (cm) d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

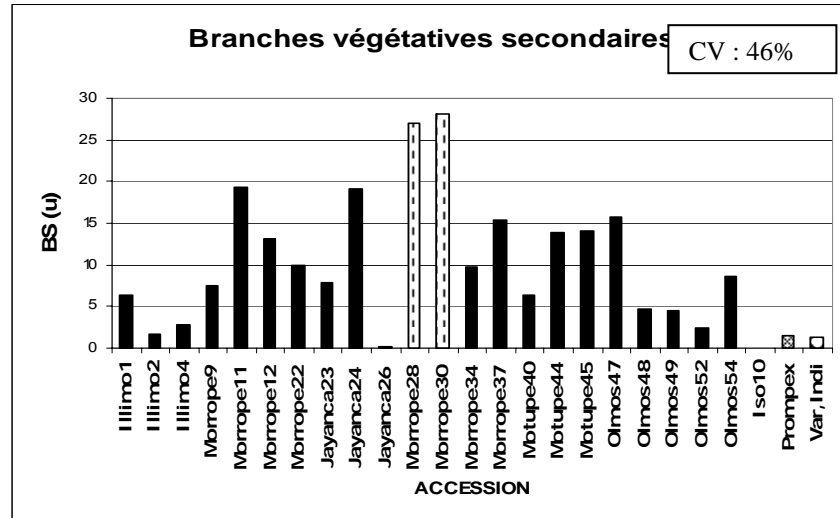


**Figure 46 :** Comparaison des moyennes du nombre de branches primaires par plante d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Pour la caractéristique du nombre de branches secondaires (**figure 47**), Les accessions Morrope30 (28,1) et Morrope28 (27,1) présentent le plus grand nombre de branches. L'accession Jayanca26 (0,3) présente le plus petit nombre, même plus petit que celui des témoins Prompex2000

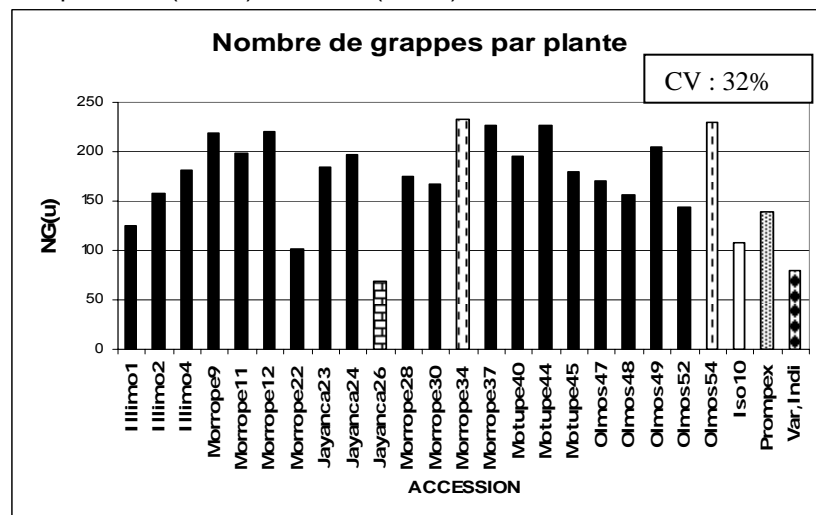


(1,5) et de la variété indienne (1,4). La variété ISO10 ne présente aucune branche secondaire.



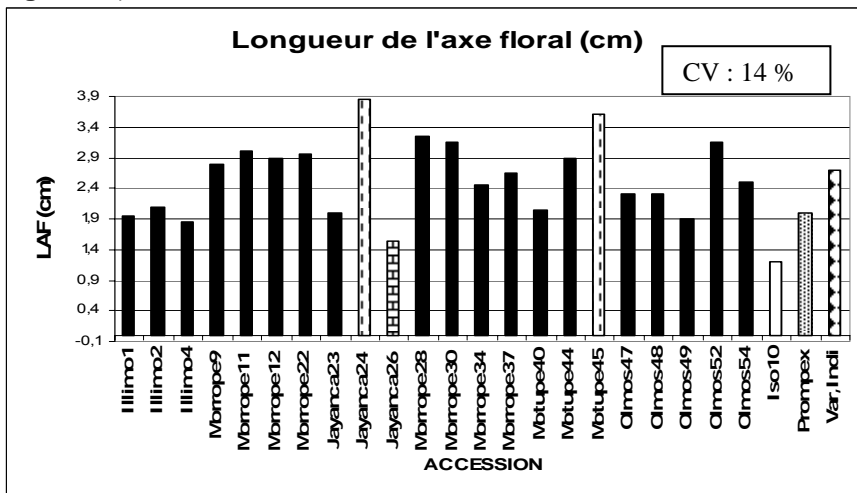
**Figure 47** : Comparaison des moyennes du nombre de branches secondaires par plante du germoplasme caractérisé à *Lambayeque* - Pérou.

Pour la caractéristique du nombre de grappes par plante (**figure 48**), l'accession Morrope34 (233) et Olmos54 (230) présentent le nombre de grappes le plus élevé. L'accession Jayanca26 (68,7) présente le plus petit nombre même plus petit que celui des témoins de la variété indienne (80,9), Prompex2000 (138,7) et ISO10 (107,2).



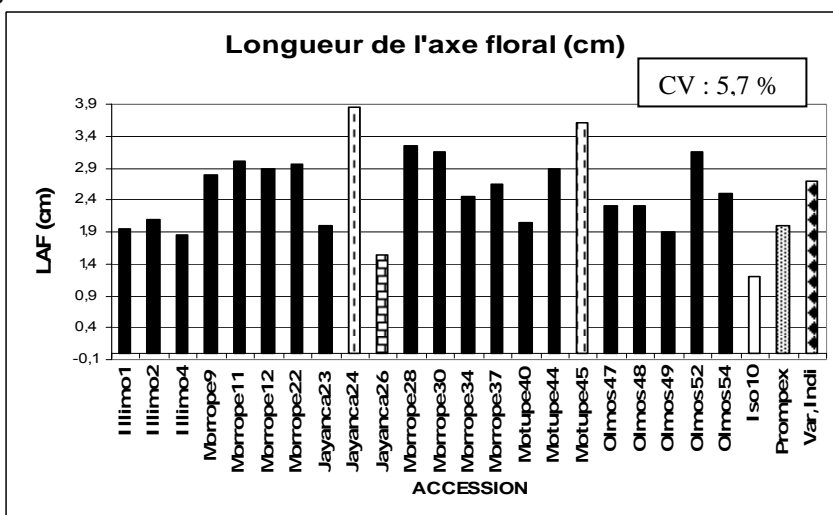
**Figure 48** : Comparaison des moyennes du nombre de grappes par plante d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à *Lambayeque* - Pérou.

Pour la caractéristique de la longueur de l'axe floral (cm), l'accession Jayanca26 (1,5) présente la plus petite longueur, plus petite que celles des témoins Prompex2000 (2,0) et de la variété indienne (2,7). Le témoin ISO10 présente une longueur de 1,2 cm. Les accessions Jayanca24 (3,8) et Motupe45 (3,6) présentent les plus grandes longueurs de l'axe floral. (Figure 49).



**Figure 49 :** Comparaison des moyennes de longueur de l'axe floral par plante (cm) plante d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Pour la caractéristique longueur de la gousse (figure 50), l'accession Morrope28 (9,4) a présenté la longueur la plus grande, même plus grande que celle du témoin Prompex2000 (7,9). Les accessions Morrope11 (6,5) et Morrope12 (6,8) ont présenté la plus courte taille de gousse.



**Figure 50 :** Comparaison des moyennes de longueur de gousse d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

## 2.2 Descripteurs quantitatifs - agronomiques

La caractérisation agronomique a été faite sur base des descripteurs présentés dans le **tableau 15** (page 78). Les résultats de cette caractérisation ont été repris dans le **tableau 26** (moyennes de 20 plantes) de la page 112. De la même façon la caractérisation sur base des plantes ayant servi pour l'analyse moléculaire (5 plantes- *phytoPASS*) a été réalisée et est présentée dans le **tableau 27** (page 113). Afin d'étudier la variabilité phénotypique existante, on a effectué une ANOVA et une comparaison de moyennes qui sont décrites ci-dessous.

### 2.2.1 Variabilité phénotypique

Suite à l'analyse ANOVA, toutes les caractéristiques ont eu une haute signification statistique, sauf le pourcentage de grain à la première récolte (%GS1). Le CV%, les valeurs moyennes et la gamme de valeur des caractères quantitatifs évalués (**tableau 29**) nous donnent une idée de la variabilité du germoplasme caractérisé.

**Tableau 29** : Variabilité des descripteurs agronomiques quantitatifs du *pigeonpea* évalués : coefficient de variabilité (CV%) moyenne, gamme de valeurs (maximum et minimum valeur) et signification statistique.

Descripteurs	Sigle	Unités	CV %	Moyenne	Minimum	Maximum	Signification
Jours à 50% de floraison	JF	Jours	8,8	152,2	66,5	263,6	**
Maturité physiologique	MF	Jours	5,9	230,7	139,3	342,6	**
Pourcentage de grains secs à la première récolte	%GS1	%	7,1	59,7	45,7	69,9	*
Nombre de gousses par plante totale	NGo/P	Unités	25,4	210,7	77,2	439,5	**
Nombre de grains par gousse	NGr/G	Unités	5,6	4,7	2,9	5,5	**
Poids de 100 grains	P100G	gr	5,1	18,0	14,7	23,3	**
Rendement de grains secs par plante 1ère récolte	RGS1	gr	29,7	82,3	32,3	181,8	**
Rendement de grains secs par plante 2ème récolte	RGS2	gr	21,8	53,4	20,5	92,9	**
Rendement de grains secs par plante récolte totale	RGST	gr	25,2	135,7	52,8	268,6	**

\*\* statistiquement hautement significative

\* statistiquement significative

ns statistiquement non significative

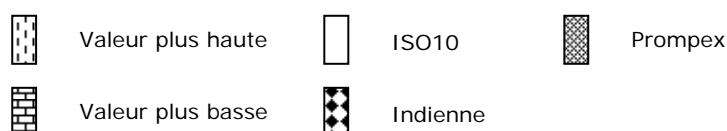
En précocité, trois descripteurs ont été évalués, dont jours à 50% de floraison est le plus variable (8,8%) dans le germoplasme étudié. La précocité est un facteur adaptatif qui permet de maintenir un rendement ou

une qualité satisfaisante malgré les stress (thermiques, hydriques, déficit énergétique, azote...)

Concernant les descripteurs de rendement, le germoplasme montre une haute variabilité exprimée par le CV% de rendement de grains verts (35,5%), rendement total de grains verts par plante (33,4%), nombre de gousses par plante à la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> récolte ainsi qu'à la récolte totale (31,9%, 19,8%, et 25,4%), rendement de grains secs par plante à la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> récolte ainsi qu'à la récolte totale (29,7%, 21,8% et 25,2 %).

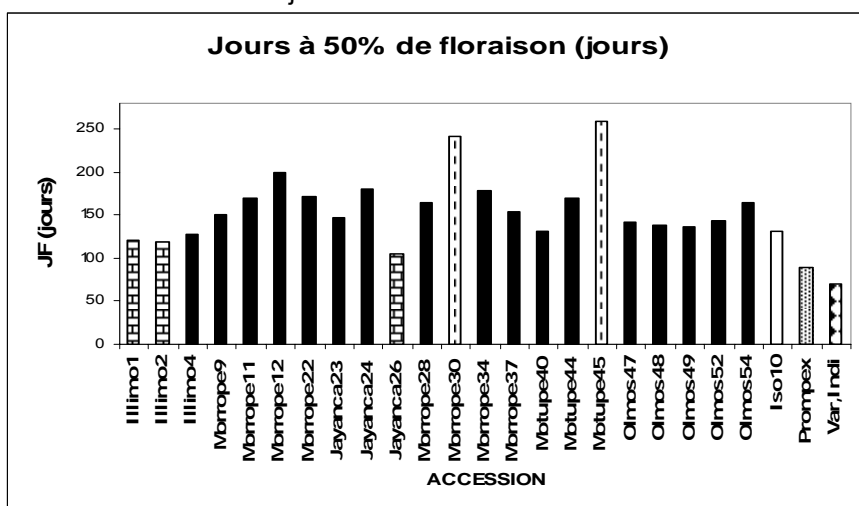
## 2.2.2 Comparaison de moyennes

Nous avons élaboré un graphique sur base d'une moyenne de 20 plantes par accession pour chaque descripteur (graphiques de 51 à 57). Les accessions qui ont la plus haute et la plus basse valeur de descripteur ont été montrées. Les valeurs propres à chaque témoin sont indiquées dans les histogrammes (voir légende ci-dessous).



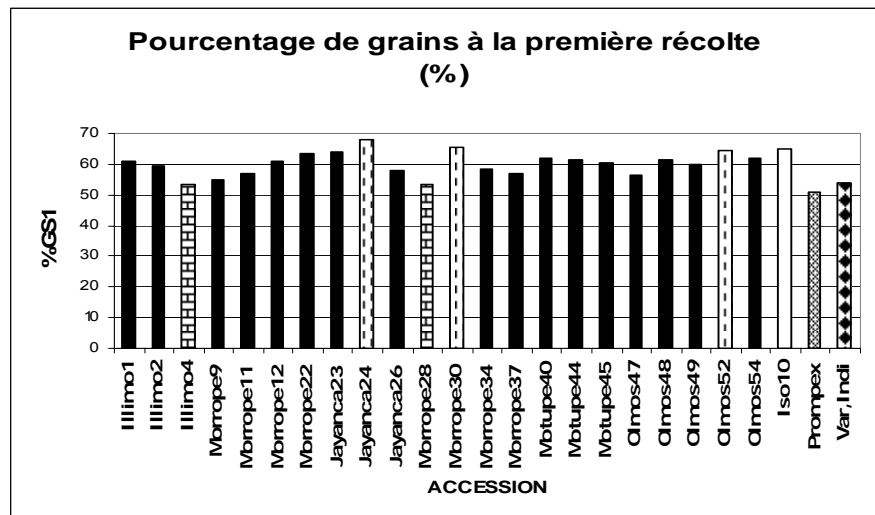
Une barre d'un même style indique qu'il n'existe pas de différences significatives sur base du test de Duncan ( $p=05$ ).

Pour les descripteurs de précocité (**figure 51**) les accessions Jayanca26, Illimo2 et Illimo1 se sont montrées les plus précoces avec 105, 118 et 120 jours à la floraison, encore plus précoces que le témoin ISO10 avec 131 jours. Les accessions Motupe45 et Morrope30 ont été les plus tardives avec 259 et 241 jours à la floraison.



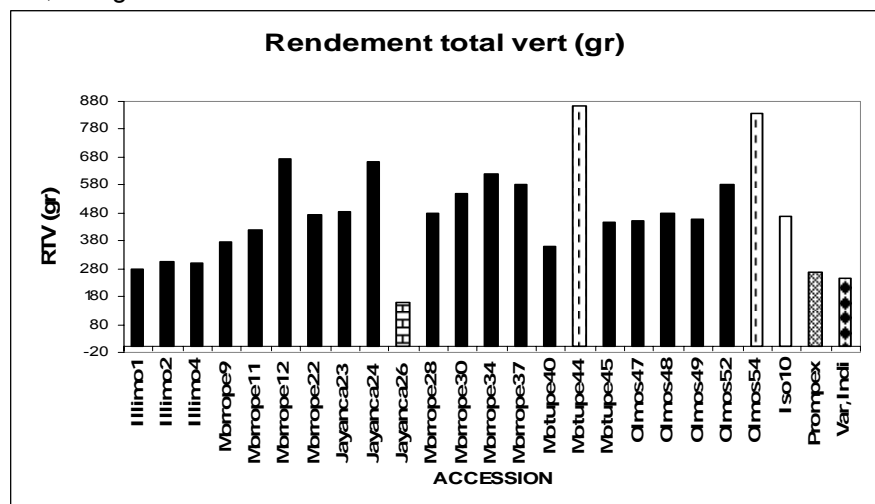
**Figure 51** : Comparaison des moyennes de Jours à 50% de floraison d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Une autre caractéristique qui exprime la précocité est le pourcentage de grains secs à la première récolte par rapport à la récolte totale (**figure 52**). Dans ce descripteur, les accessions Jayanca24 et Morrope30 se sont montrées les plus précoces avec 67 et 65 %; alors que les accessions Illimo4 et Morrope28 avec 53% se sont montrées les plus tardives.



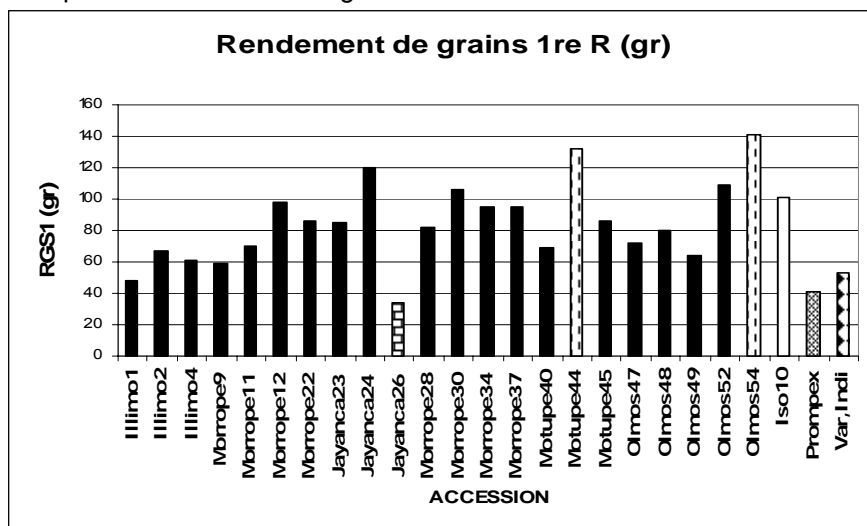
**Figure 52:** Comparaison des moyennes de pourcentage de grains secs à la première récolte d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

En ce qui concerne le rendement de grains verts (**figure 53**), les accessions Motupe44 et Olmos54 avec 865 et 839 gr ont été les plus productives. L'accession Jayanca26 avec 157 gr a été la moins productive, moins que les témoins ISO10, Prompex2000 et la variété indienne avec 469, 265, 245 gr.



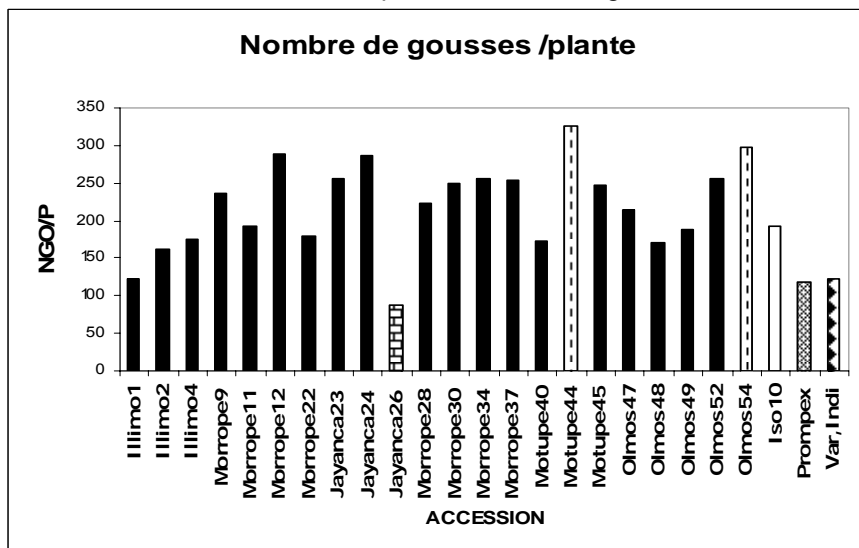
**Figure 53 :** Comparaison des moyennes de rendement total en grains vert (gr) d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Pour le rendement de grains secs dans la première récolte (**figure 54**), les accessions Olmos54 et Motupe44 avec 141 et 132 gr ont été les plus productives. L'accession la moins productive a été Jayanca26 avec 33 gr. par plante, même moins que les témoins de la variété indienne et Prompex2000 avec 53 et 41 gr.



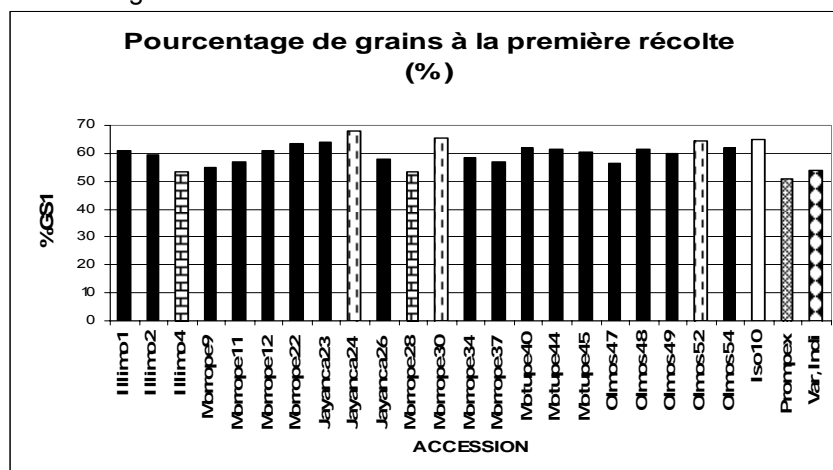
**Figure 54** : Comparaison des moyennes de rendement de grains secs 1<sup>re</sup> récolte (gr) d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Concernant les composantes de rendement (**figure 55**), les accessions Motupe44 et Olmos54 avec 325, 298 gousses ont présenté le plus grand nombre. L'accession Jayanca26 avec 88 gousses a présenté un nombre inférieur au témoin Prompex2000 avec 117 gousses.



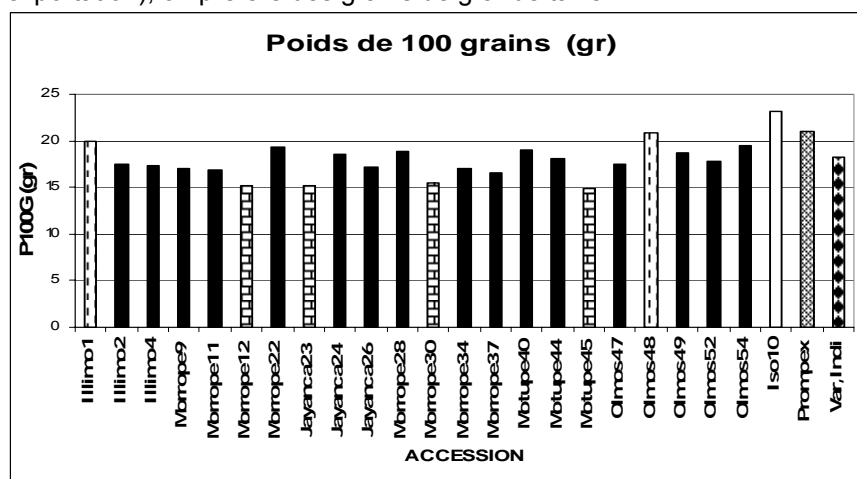
**Figure 55** : Comparaison des moyennes de nombre de gousses total d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Concernant le nombre de grains par gousse (**figure 56**), les accessions Olmos54 (5,3) et Olmos52 (5,2) ont présenté un nombre plus élevé que les témoins ISO10 et Prompex2000 (4,7 et 4,9 grains). L'accession Morrope9 (3,5) a présenté le nombre le moins élevé de grains par gousse. Au point de vue agro-industriel, on préfère des gousses avec un nombre de grains élevé.



**Figure 56** : Comparaison des moyennes de nombre de grains par gousse d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

Pour la caractéristique du poids de 100 grains (**figure 57**) les accessions Olmos48 (20,8) et Illimo1 (19,9) ont présenté le poids le plus élevé, supérieur à celui du témoin de la variété indienne (18,3) mais inférieur à celui des témoins Prompex2000 (21) et ISO10 (23,2). Les accessions Motupe45 (14,8), Jayanca23 (15,1), Morrope12 (15,2) et Morrope30 (15,5) ont présenté le poids le plus bas. Au point de vue agro-industriel (pour l'exportation), on préfère des grains de grande taille.



**Figure 57** : Comparaison des moyennes du poids de 100 grains (gr) d'une collection de *pigeonpea* caractérisée à Lambayeque - Pérou.

## 2.3 Corrélation agro-morphologique

Le coefficient de corrélation quantifie le degré d'association ou de variation commun aux deux descripteurs. Le signe du coefficient indique le type d'association : négatif (-) si la relation est inversée et positif (+) si la relation est directe. Si le coefficient s'approche de 1, les deux descripteurs sont étroitement corrélés. Par contre, si la valeur s'approche de zéro, cela peut indiquer qu'il existe une indépendance entre les variables. Dans le but de caractériser les accessions péruviennes, on a utilisé que les moyennes de 22 accessions péruviennes sans les témoins.

Dans un premier temps on a utilisé les 17 descripteurs quantitatifs, pour établir les corrélations. Dans cet ensemble une forte corrélation ( $r \geq 0,98$ ) a été observée entre jours à 50% de floraison (JF) et les jours à maturité physiologique (MF). De même, entre rendement de grains secs à la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et à la récolte totale (RGS1<sup>a</sup>C, RGS2<sup>a</sup>C, RGST). Pour tel raison on a retenue les jours à 50% de floraison (JF) et non les jours à maturité physiologique (MF), comme descripteur de précocité. Egalement comme descripteur de rendement on a seulement retenu le rendement de grain sec total (RGST).

Notre matrice de corrélation de Pearson a été élaborée donc sur base des 14 descripteurs quantitatifs (**tableau 30**). Elle a montré 30 coefficients significativement différents de zéro ( $\alpha = 0,05$ ).

Une forte corrélation (0,95) a été mise en évidence entre la hauteur de la plante (HP) et le diamètre de la tige (DT). Chacune de ces descripteurs a montré une haute corrélation avec les jours à la floraison (JF) (0,86 et 0,83), les nombres de branches secondaires (BS) (0,53 et 0,58), le nombre de grappes (0,51 et 0,52), la longueur de l'axe floral (0,70 et 0,65), le nombre total de gousses (NGo/P) (0,75 et 0,80) et le rendement total de grains secs (RGST) (0,71 et 0,78).

Ces corrélations montrent que les plantes tardives ont une plus haute croissance et elles ont tendance à développer une plus grande ramification et par conséquent, un plus haut rendement. Toutefois, la corrélation négative des jours à la floraison (JF) avec le poids de 100 graines (P100G) (-0,52) montre que les plantes tardives tendent vers un grain de plus petite taille. Aussi, on a pu constater que le rendement total en grain n'est pas du tout corrélé au poids de 100 graines (P100G), c'est que pourrais être utile dans la sélection des accessions tardives ou semi-tardives avec graines de grand taille (pour l'exportation).

Camarena et al. (1996), ont réalisé une caractérisation de 16 accessions d'origine équatorienne à l'aide de descripteurs de précocité et de rendement, celle-ci a permis de développer une variété à partir de la famille la plus performante, avec 108 jours à floraison, 156 jour à maturité de récolte et 53% de rendement de grains secs à la première récolte (1,2 tonne par hectare) et un poids de 100 graines de 18gr.



**Tableau 30** : Matrice de corrélation de Pearson de descripteurs quantitatifs basée sur moyennes / accession de *pigeonpea*.

Caractéristiques	sigles	HP	DT	BP	BS	NG	LAF	LoG	LaG	JF	%GSI	NGoP	PI00G	NGoG
Hauteur de plante	HP	1												
Diamètre de la tige	DT	0,95	1											
Nombre de branches primaires par plante	BP	0,38	0,27	1										
Nombre de branches secondaires par plante	BS	0,53	0,58	0,55	1									
Nombre de grappes	NG	0,51	0,52	0,24	0,29	1								
Longueur de l'axe floral	LAF	0,70	0,65	0,61	0,68	0,25	1							
Longueur de la gousse	LoG	0,03	0,16	-0,30	0,26	-0,25	0,13	1						
Largeur de la gousse	LaG	0,19	0,23	0,30	0,35	0,31	0,11	-0,18	1					
Jours à 50% de floraison	JF	0,86	0,83	0,53	0,67	0,31	0,76	-0,08	0,27	1				
% de grains secs à la première récolte	%GSI	0,34	0,27	-0,03	0,05	-0,11	0,32	-0,08	0,17	0,31	1			
Nombre de gousses par plante	NGoP	0,75	0,80	0,16	0,46	0,73	0,62	-0,01	0,20	0,59	0,31	1		
Poids de 100 grains	PI00G	-0,34	-0,29	-0,19	-0,26	-0,22	-0,21	0,48	-0,01	-0,52	0,05	-0,33	1	
Nombre de grains par gousse	NGoG	0,37	0,42	-0,19	0,18	-0,05	0,23	0,38	-0,03	0,28	0,41	0,36	-0,02	1
Rendement de grains secs Total	RGST	0,71	0,78	0,06	0,42	0,58	0,58	0,24	0,21	0,50	0,36	0,89	-0,03	0,64

Les valeurs en **gras** sont significativement différentes de 0 à un niveau de signification  $\alpha=0,05$

## 2.4 Analyse en composantes principales (ACP)

L'ACP permet de connaître la relation existante entre les descripteurs considérés et les similitudes entre les accessions. Ce type d'analyse nous permet également de sélectionner les descripteurs quantitatifs les plus discriminants pour limiter le nombre de mesures de caractérisations ultérieures.

L'analyse a été faite sur base d'un échantillon de 20 plantes et un échantillon de 5 plantes (*phytoPASS*). Les valeurs moyennes utilisées sont celles reprises dans les **tableaux 26** et **27** (pages 112 et 113).

### 2.4.1 Sur base d'un échantillon de 20 plantes

Dans notre analyse de 14 descripteurs ou caractéristiques, la première composante principale explique 46,3% de la variabilité, la deuxième 15,6% de la variabilité et donc une variabilité cumulée de 61,9%.

Les coefficients des vecteurs propres des descripteurs quantitatifs étudiés et les deux premières composantes principales (**tableau 31**), montrent qu'une forte structuration de la première composante CP1 est définie positivement par les caractères : taille de la plante (**HP**), diamètre de la tige (**DT**), jours à 50% de floraison (**JF**), nombre de gousses par plante (**NGo/P**) et rendement total de grains secs (**RGST**). Tandis que la deuxième composante CP2 est fortement corrélée avec la longueur de la gousse (**LoG**) et le nombre de grains par gousse (**NGr/G**).

**Tableau 31** : Vecteurs propres des 14 descripteurs quantitatifs et les 2 composantes principales.

Descripteurs	Sigle	CP1	CP2
Hauteur de la plante	HP	<b>0,355</b>	0,109
Diamètre de la tige	DT	<b>0,361</b>	0,133
Nombre de branches primaires par plante	BP	0,219	-0,313
Nombre de branches secondaires par plante	BS	0,296	-0,034
Nombre de grappes	NG	0,274	-0,194
Longueur de l'axe floral	LAF	0,286	0,069
Longueur de la gousse	LoG	-0,114	<b>0,518</b>
Largeur de la gousse	LaG	0,179	-0,200
Jours à 50% de floraison	JF	<b>0,357</b>	-0,056
% de grains secs à la première récolte	%GS1	0,167	0,162
Nombre de gousses par plante	NGo/P	<b>0,347</b>	0,109
Poids de 100 grains	P100G	-0,195	0,237
Nombre de grains par gousse	NGr/G	0,037	<b>0,558</b>
Rendement de grains secs Total	RGST	<b>0,302</b>	0,333

Ces résultats montrent que la première composante a permis de distinguer les accessions de plus grande taille et de diamètre de la tige plus grand qui fleurissent et arrivent à maturité plus tardivement et qui ont un rendement de grains plus élevé. Tandis que la deuxième composante a permis d'identifier les accessions qui possèdent des caractéristiques agro-industrielles de gousse et de grains les plus appréciés, comme une plus grande longueur de gousse et un nombre de grains par gousse plus élevé.

La projection des descripteurs évalués sur les deux axes de composantes principales (**figure 58**, page 128) montre d'abord une proximité des caractères : hauteur de la plante (**HP**), diamètre de la tige (**DT**) et nombre de gousses par plante (**NGo/P**) qui définissent l'axe CP1 avec le rendement total de grains secs (**RGST**) et jours à 50% de floraison (**JF**).

Nous remarquons également une analogie des caractères de la gousse et de la graine : longueur de la gousse (**LoG**) et nombre de grains par gousse (**NGr/G**) qui définissent l'axe CP2, ce que nous avons montré dans le **tableau 31**.

La projection de 25 accessions sur le plan formé par les deux axes de l'ACP montre une variabilité au sein des accessions évaluées. Celle-ci est démontrée par la dispersion en nuage de points représentant les accessions (**figure 60**, page 129).

On retrouve des accessions éloignées du reste comme les Motupe45 et Morrope30 qui sont tardives et de grande taille par rapport aux nouvelles fonctions explicatives associées aux composantes principales. Les variétés améliorées ISO10, Prompex2000 et la variété indienne sont proches entre elles et sont précoces ainsi que de petite taille.

Dans l'étude de Upadhyaya *et al.*, (2005), les accessions du germoplasme d'Océanie étaient caractérisées par une courte durée de croissance, une petite taille, peu de branches, des gousses avec peu de grains, une plus petite taille de grain et de faibles rendements en grains. Les accessions d'Afrique étaient plus tardives, d'une taille plus grande, avec des gousses multi grains et de plus grands grains.

#### 2.4.2 Sur base d'un échantillon de 5 plantes (phytoPASS)

Comme dans l'analyse de corrélation de Pearson, l'analyse ACP a été basée sur 14 descripteurs (de 17 au total) parce que les analyses de corrélation nous ont montré une haute corrélation entre jours à 50% de floraison (**JF**) et les jours à maturité physiologique (**MF**). De même, entre rendement de grains secs 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> récolte et récolte total (**RGS1**, **RGS2**, **RGST**). Ce qui nous a permis d'utiliser seulement **JF** et **RGST** comme descripteurs de précocité et de rendement.

Dans notre analyse ACP, la première composante principale explique 37,2% de variabilité et la deuxième 19,6%. Ce qui nous donne une variabilité cumulée de 56,8%. Les coefficients des vecteurs propres des descripteurs quantitatifs étudiés et les deux premières composantes principales (**tableau 32**) montrent qu'une haute structuration de la première composante CP1 est définie positivement par les caractères suivants : la taille de la plante (**HP**), le diamètre de la tige (**DT**), jours à 50% de floraison (**JF**), le nombre de gousses par plante (**NGo/P**) et le rendement total de grains secs (**RGST**). La deuxième composante CP2 est définie par des caractères de la gousse et de la graine : longueur de la gousse (**LoG**) et nombre de grains par gousse (**NGr/G**).

Ces résultats montrent que la première composante (CP1) a permis de distinguer les accessions de plus grande taille et de diamètre de la tige

plus grand, qui fleurissent et arrivent à maturité plus tardivement et qui ont un rendement en grains plus élevé. Tandis que la deuxième composante a permis d'identifier les accessions qui ont des caractéristiques agro-industrielles de gousse et de grains les plus appréciées, comme une plus grande longueur de gousse, et un nombre de grains par gousse plus élevée.

**Tableau 32** : Vecteurs propres de 14 descripteurs quantitatifs et les 2 premières composantes principales.

Descripteurs	Sigle	CP1	CP2
Hauteur de plante	HP	<b>0,399</b>	0,102
Diamètre de la tige	DT	<b>0,418</b>	0,073
Nombre de branches primaires par plante	BP	0,277	-0,234
Nombre de branches secondaires par plante	BS	0,253	-0,236
Nombre de grappes	NG	0,125	-0,033
Longueur de l'axe floral	LAF	0,248	-0,105
Longueur de la gousse	LoG	-0,047	<b>0,506</b>
Largeur de la gousse	LaG	0,195	-0,210
Jours à 50% de floraison	JF	<b>0,390</b>	-0,173
Nombre de gousses par plante	NGo/P	<b>0,373</b>	0,145
Poids de 100 grains	P100G	-0,049	0,355
Nombre de grains par gousse	NGr/G	0,106	<b>0,470</b>
Rendement de grains secs Total	RGST	<b>0,308</b>	0,362

La projection des descripteurs évalués sur les deux axes de composantes principales (**figure 59**, page 128) montre d'abord une proximité des caractères : hauteur de la plante (**HP**), diamètre de la tige (**DT**) et nombre de gousses /plante (**NGo/P**) qui définissent l'axe CP1 avec le rendement total de grains secs (**RGST**) et jours à 50% de floraison (**JF**). Cette projection montre aussi une proximité des caractères de la gousse et de la graine : longueur de la gousse (**LoG**) et nombre de grains par gousse (**NGr/G**) que définit l'axe CP2, ce qui confirme ce que nous avons montré dans le **tableau 32**.

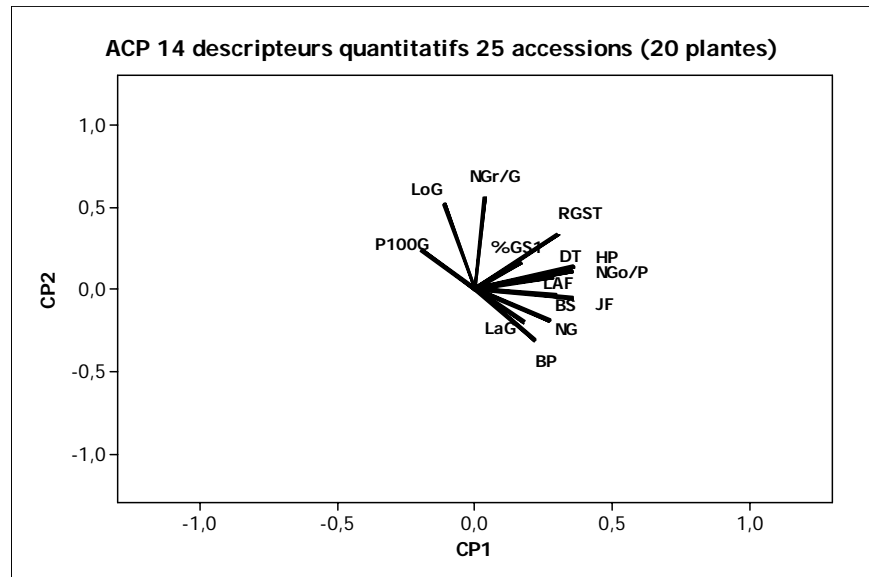
La projection de 25 accessions sur le plan formé par les deux axes de l'ACP montre une variabilité au sein des accessions évaluées. Celle-ci est démontrée par la dispersion du nuage de points représentant les accessions (**figure 61**, page 129).

Comme dans l'analyse avec l'échantillon de 5 plantes (*phito-PASS*) les accessions Motupe45 et Morrope30 sont éloignées du reste. Par rapport aux nouvelles fonctions explicatives associées aux composantes principales, on peut dire ces accessions sont tardives, de grande taille et de haut rendement. De la même façon les variétés améliorées Prompex2000 et la variété indienne sont proches et caractérisées par leur précocité et leur petite taille.

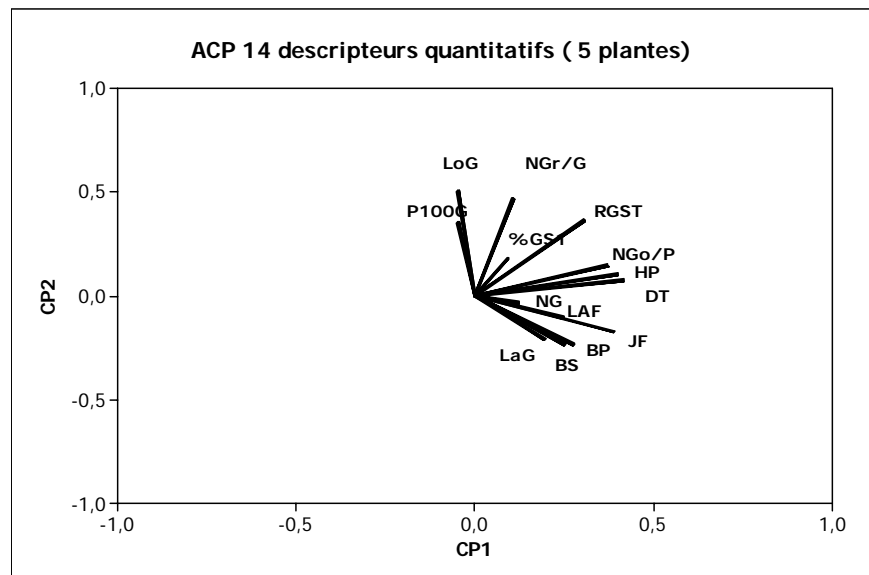
Les résultats sont semblables soit en utilisant un échantillon de 20 plantes ou de 5 plantes-*phytoPASS*, comme on le constate par la similitude des **figures 58 et 59**.

Manyasa et al (2008) dans l'étude de caractérisation des *landraces* de *pigeonpea* en Tanzanie, des analyses des composantes principales et une analyse de clusters ont été réalisés également, la variabilité du

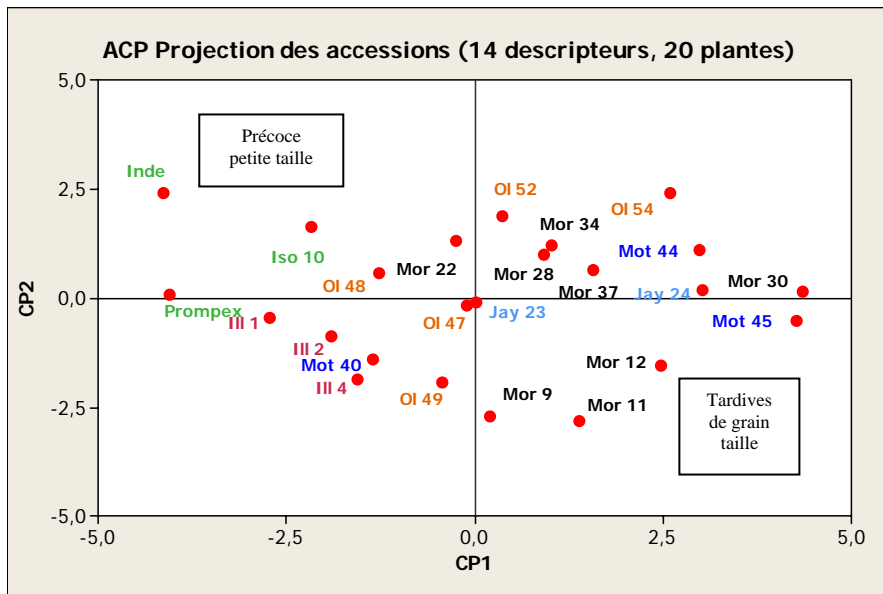
germoplasme a été basée sur les jours à la floraison, les jours à la maturité, la hauteur de la plante, le nombre de branches primaires et secondaires et le nombre de grappes par plante.



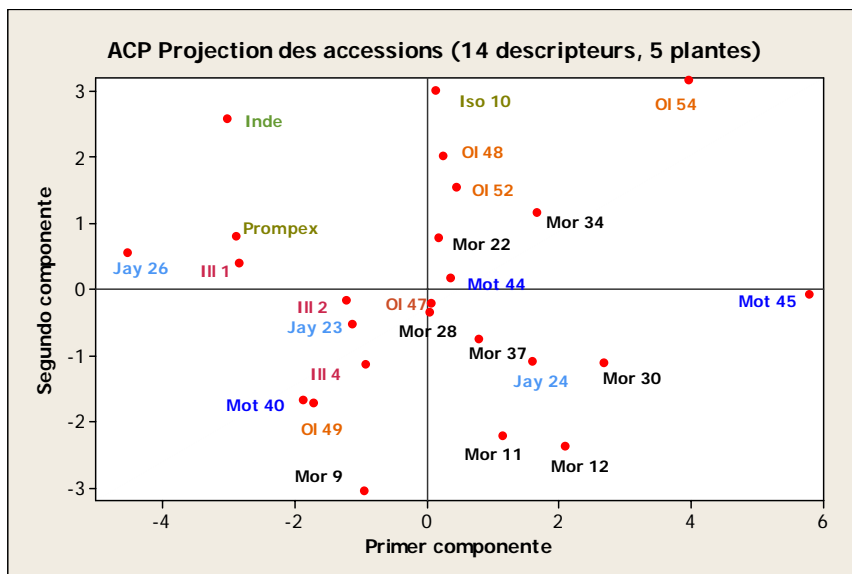
**Figure 58 :** Projection de 14 descripteurs quantitatifs du *pigeonpea* sur les 2 premiers axes principaux de l'ACP expliquant 66,68% de la variabilité totale.



**Figure 59:** Projection de 14 descripteurs quantitatifs sur les 2 premiers axes principaux de l'ACP expliquant 62,18% de la variabilité totale.



**Figure 60 :** Projection de 25 accessions de *pigeonpea* sur les 2 premiers axes principaux de l'ACP basés sur 14 descripteurs quantitatifs des moyennes de 20 plantes.



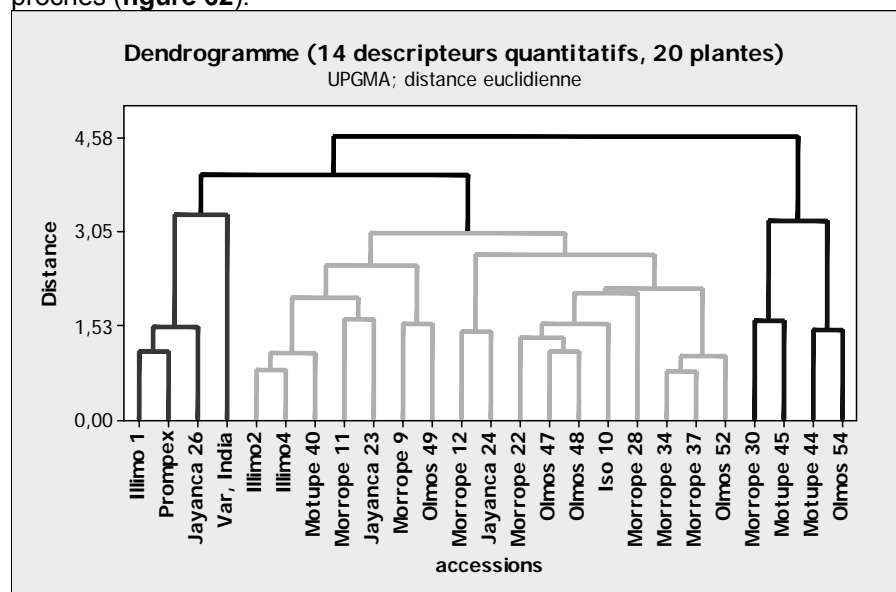
**Figure 61:** Projection de 25 accessions de *pigeonpea* sur les 2 premiers axes principaux de l'ACP basés sur 14 descripteurs quantitatifs des moyennes de 5 plantes-*phytoPASS*.

## 2.5 Regroupement par relations de ressemblance

L'objectif de cette analyse est de classer l'ensemble de 25 accessions en un nombre réduit de groupes ou clusters, où la formation de ces groupes peut obéir à des caractéristiques communes aux accessions. Afin de grouper les accessions de la collection en clusters relativement homogènes sur base de la ressemblance entre elles, on a utilisé l'analyse de clusters basée sur la distance euclidienne. Dans cette analyse les 7 caractères ayant une contribution à la variabilité totale expliquée par les axes de l'ACP ont été utilisés : la taille de la plante (HP), le diamètre de la tige (DT), jours à 50% de floraison (JF), le nombre de gousses par plante (NGO/P) et le rendement total de grains secs (RGST) et les caractères de la gousse et de la graine : longueur de la gousse (LoG) et nombre de grains par gousse (NGr/G).

L'échantillon pris en considération a été de 20 plantes, en utilisant 5 plantes on arrive aux résultats très semblables, donc l'analyse en utilisant 20 plantes est présenté ci-dessous.

L'analyse hiérarchique basée sur la distance euclidienne en utilisant la méthode UPGMA a permis de classer les accessions en trois clusters, ces groupes, constitués chacun des accessions morphologiquement très proches (**figure 62**).



**Figure 62:** Dendrogramme réalisé à partir de distances euclidiennes calculées sur base de 14 descripteurs quantitatifs et un échantillon de 20 plantes, chez 25 accessions de *pigeonpea*.

- Le cluster 1 des accessions tardives de haute taille et de haut rendement (Morrope30, Motupe45, Motupe44 et Olmos54).

- Le cluster 2 des accessions précoces de taille basse, de bas rendement, de grand nombre de grains par gousse et de gousses longues. (Jayanca26 et Illimo1).
- Le troisième cluster formé pour le reste des accessions péruviennes. Dans ce groupe deux sous- groupes se observent.

Si on veut caractériser la variabilité des *landraces* péruviennes dans le but de l'utiliser (avant qu'elle ne disparaisse face à la croissance des variétés améliorées dans une culture intensive) notre choix des témoins s'est porté sur les variétés améliorées qui pourront déplacer ces *landraces* locales. Un autre point de référence pour l'analyse de la variabilité des *landraces* est le germoplasme indien et le germoplasme africain. Malheureusement, cela n'a pas été possible de se procurer une variété africaine avant le démarrage des essais à *Lambayeque* - Pérou.

Si on compare les rendements individuels, les variétés améliorées semblent être moins productives que le reste des accessions. Mais si on parle de rendement / temps, les variétés améliorées sont plus précoces que les *landraces*, plus tardives. Par exemple, le rendement de grain sec de la *landrace* la plus productive (Motupe44) a été de 209 gr/plante (6,9 ton/ha) laquelle a été récolté à 248 jours (8 mois) du semis, par contre la variété améliorée (Prompex2000) a eu un rendement de 81 gr/ plante (2,6 ton/ha) en 167 jours (5 mois).

Si on parle de rendement de grain vert, la durée se réduit d'un mois, mais les intervalles de récoltes sont très variables dans les *landraces*. Dans la variété améliorée Prompex au contraire, la taille de la plante est plus petite, la gousse est droite et longue ce qui engendre une récolte plus facile et moins coûteuse. Ces derniers facteurs font que les variétés améliorées sont préférées des agroindustriels qui prennent en charge le coût de la récolte. Comme ces derniers fournissent les semences, les agriculteurs sont indirectement tentés de changer les *landraces* par les variétés améliorées.

### 3. Conclusions

La caractérisation morphologique des accessions étudiées a mis en évidence une variabilité intra accession, observable parmi les 46 catégories possibles des 14 descripteurs utilisés chez les 25 accessions étudiées.

On a mis en évidence l'homogénéité de l'accession **Jayanca26** et de la variété **Prompex2000** pour 12 descripteurs qualitatifs (**tableau 21**). Elles se caractérisent par une habitude de croissance de type érigée, un type de floraison déterminé, une insertion de branche compacte, une pigmentation vert-jaune de la tige, une pigmentation du calice du type c, une couleur grenat de la gousse avec des taches, un profil de gousse cylindrique, une couleur de la corolle RG (rose glabre de même intensité que la partie dorsale, nervure invisible avec tache inférieure ventrale), une forme de la gousse droite, une forme de grain sec circulaire et enfin, une couleur du grain sec beige claire.

La variété améliorée **ISO10** est homogène pour 11 descripteurs. Elle se caractérise par une habitude de croissance de type érigée, un type de



floraison déterminé, une insertion de branche semi-compacte, une pigmentation vert-jaune de la tige, une pigmentation du calice du type b, un profil de gousse plat, une couleur de la corolle A (jaune sans pigmentation secondaire), une forme de la gousse droite, et une forme de grain sec réni-forme avec de taches.

On observe clairement aussi que **Morrope30** est une accession homogène pour 10 descripteurs qualitatifs, entre autres la forme de la gousse *mojarra*, la pigmentation dorsale de la gousse, la forme des folioles oblongue et la couleur de grain sec beige rose.

De la même façon **Olmos52** avec 12 descripteurs homogènes, elle se caractérise par une habitude de croissance de type érigée, un type de floraison déterminé, une insertion de branche semi-compacte, une couleur grenat de la gousse avec des taches, un profil de gousse plat, une forme de la gousse droite, une couleur de grain beige claire avec de taches.

L'accession **Motupe45** se caractérise par une habitude de croissance de type érigée de type indéterminée, un type de floraison indéterminé, une insertion de branche ouverte, un profil de gousse cylindrique, une forme de folioles oblongue, une forme de la gousse droite, une forme du grain sec circulaire, une couleur de grain beige rose.

L'accession **Illimo4** se caractérise par son homogénéité sur 10 descripteurs. Elle se caractérise par une habitude de croissance de type érigée, un type de floraison déterminé, une insertion de branche semi-compacte, une pigmentation vert-jaune de la tige, une pigmentation du calice du type c, une gousse plate, une pigmentation totale, une forme *mojarra*, et une couleur du grain sec beige claire avec de taches.

Une grande variabilité des caractéristiques qualitatives : forme de folioles, pigmentation du calice, couleur de la gousse, couleur secondaire de la gousse, forme de la gousse, forme du grain, couleur du grain et couleur secondaire du grain, a été mise en évidence entre les accessions péruviennes comparées aux témoins (variétés améliorées et variété indienne).

Les descripteurs qualitatifs: la forme des folioles, la couleur de la corolle, la forme de la gousse, la forme de la graine et la couleur principal et secondaire de la graine sont suffisamment discriminants pour la caractérisation entre accessions de *pigeonpea*.

On a mis en évidence une forte corrélation entre la hauteur de la plante et le diamètre de la tige. Et ceux-ci sont corrélés avec les jours à la floraison, les nombres de branches secondaires, le nombre de grappes, la longueur de l'axe floral, le nombre total de gousses et le rendement total de grains secs. Ces corrélations montrent que les plantes tardives ont une plus haute croissance et elles ont tendance à développer une plus grande ramification et par conséquent, un plus haut rendement. Toutefois, la corrélation négative des jours à la floraison avec le poids de 100 graines montre que les plantes tardives tendent vers une graine de plus petite taille. On a pu également constater que le rendement total en grain n'est pas du tout corrélé au poids de 100 graines, ce qui pourrait être utile dans la

sélection des accessions tardives ou semi-tardives avec graines de grande taille.

Des descripteurs discriminants ont été observés, ils concernent principalement la hauteur de la plante, le diamètre de la tige, le nombre de jours à 50% de floraison, le nombre de gousses par plantes, le rendement de grains secs et aussi la longueur de la gousse ainsi que le nombre de grains par gousse. Concernant ces descripteurs discriminants, on peut distinguer les accessions de plus grande taille et de diamètre de la tige plus grand, qui fleurissent et arrivent à maturité plus tardivement, celles-ci jouissant d'un rendement en grains plus élevé. Nous pouvons également identifier les accessions ayant les caractéristiques agro-industrielles de gousse et de grains les plus appréciées, comme une plus grande longueur de gousse, et un nombre de grains par gousse plus élevé.

On a mis en évidence la présence de 2 groupes contrastés: Le groupe 1 des accessions tardives et semi-tardives, de haute taille et de haut rendement (Motupe45, Morrope30, Olmos54 et Motupe44). Le groupe 2 des accessions précoces, de taille basse, de bas rendement, de grand nombre de grains par gousse et de gousses longues. (Jayanca26 et Illimo1). Les analyses de la variance et les analyses multivariées (ACP et clusters) nous confirment la variabilité au sein des accessions péruviennes de *pigeonpea*.

D'après les analyses de clusters, les accessions péruviennes Jayanca26 et Prompex2000 sont semblables, ce qui sera confirmé par la caractérisation moléculaire.



**Figure 63 :** Parcelle expérimentale du témoin variété Prompex2000. La Molina Pérou.



**Figure 64. :** Parcelle expérimentale du témoin Variété indienne ICPL 94008. La Molina Pérou.



**Figure 65.** Prélèvement *phytoPASS*.



**Figure 66.** Etablissement des parcelles d'expérimentation. La Molina Pérou.



**Figure 67.** Etablissement des parcelles d'expérimentation. La Molina Pérou.

## INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à la caractérisation moléculaire des *landraces* péruviennes et également des variétés indiennes et africaines formant une collection de *pigeonpea*.

Nous aborderons dans un premier temps des marqueurs moléculaires de type microsatellites (SSR), leur obtention chez le *pigeonpea* et ensuite, leur utilisation dans la caractérisation moléculaire de la collection. Finalement nous étudierons l'analyse de la diversité et de la structure génétique de la collection.

## OBJECTIFS

Cette partie de notre recherche a pour but :

1. L'obtention de marqueurs moléculaires co-dominants et polymorphes de type microsatellites chez le *pigeonpea*, qui puissent nous aider à caractériser génétiquement le germoplasme péruvien par la suite.
2. La caractérisation d'une collection de *pigeonpea* par marqueurs microsatellites et l'analyse de la diversité et de la structure des accessions qui constituent la collection de *pigeonpea* en vue de conserver et utiliser les nombreux cultivars locaux existants.

## MATERIEL ET METHODES

### **1. *Matériel et méthodes relatifs à l'obtention des marqueurs de type microsatellites chez le pigeonpea***

Dans cette partie nous décrivons le matériel et les méthodes utilisés pour l'obtention des SSR chez le *pigeonpea*.

#### **1.1 Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé pour l'obtention des microsatellites était constitué de grains secs de la variété *Inia Sipan* (variété péruvienne de *pigeonpea*). Tous les grains utilisés dans cette étude ont été fournis par le Programme de Légumineuses de l'Université Nationale Agraire La Molina – UNALM (Pérou).

Ce matériel a été transvasé dans des pots à 25°C dans la chambre de culture de l'URBV (FUNDP) afin de réunir les conditions adéquates pour sa croissance végétative, dans le but de collecter les feuilles pour l'extraction d'ADN.

#### **1.2 Méthodes**

##### **1.2.1 Stérilisation des grains de pigeonpea**

Les grains ont été stérilisés en les plongeant 30 secondes dans l'alcool (éthanol 70%), 10 minutes dans l'eau de javel (8°) et deux fois deux minutes dans de l'eau désionisée stérile.

##### **1.2.2 Extraction d'ADN génomique pour la préparation des banques d'ADN**

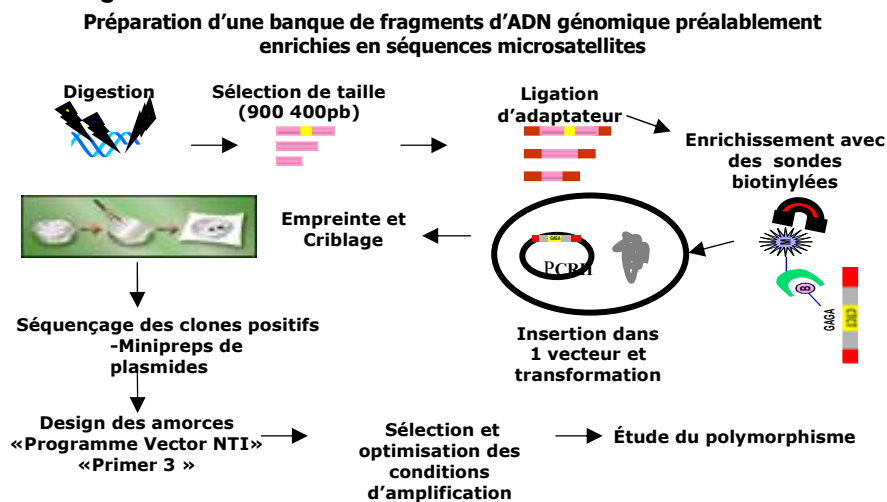
L'ADN a été extrait de feuilles de plantes de 15 semaines après broyage dans l'azote liquide en utilisant le Kit Nucleon PhitoPure (RPN8510). L'ADN extrait a été stocké à -20°C.

##### **1.2.3 Quantification d'ADN**

L'ADN a été dosé au spectrophotomètre UV/visible (Shimadzu UV-1601PC) par mesure de l'absorbance à 260 nm. Le ratio de l'absorbance de 260nm/280nm a aussi été lu afin d'estimer la pureté de l'ADN. Le ratio acceptable de l'absorbance pour l'ADN pur était de 1.7-2.0. La quantité et l'intégrité de l'ADN ont été confirmées par migration sur un gel d'agarose 1% et comparées avec un standard de taille (smart ladder Eurogentec Réf. MW-1700-10).

### 1.2.4 Isolement des loci microsatellites chez le pigeonpea

La méthode classique pour isoler des motifs microsatellites consiste à préparer une banque d'ADN génomique enrichie en séquences microsatellites et à la cribler avec une sonde correspondant à ce microsatellite d'intérêt, dans notre étude une sonde GA<sub>15</sub>. Le séquençage des clones positifs permet alors de sélectionner et de synthétiser des paires d'amorces utilisées ensuite en PCR pour mettre en évidence le polymorphisme de ces marqueurs microsatellites. Les étapes sont illustrées dans la **figure 68**.



**Figure 68** : Préparation d'une banque de fragments d'ADN génomique préalablement enrichies en séquences microsatellites.

Le protocole de base comprend la fragmentation d'ADN suivi de la ligation des fragments à un adaptateur de séquence connue. L'ADN est alors hybridé avec une sonde biotinylée en 5' contenant la répétition, qui pourrait être liée à une membrane en nylon (Stajner *et al.*, 2005) et accroché à des billes de streptavidine (Yaish et de la Vega, 2003). L'hybridation non spécifique est réduite par plusieurs lavages, après quoi l'ADN est élué et amplifié par PCR. L'ADN enrichi est finalement inséré dans un vecteur approprié. Les recombinants peuvent être directement séquencés et les motifs microsatellites sélectionnés (Temnykh *et al.*, 2001). Des amorces sont conçues au départ de l'ADN bordant ces motifs microsatellites (Glenn et Schable, 2005). Finalement, les amorces sont testées par amplification en utilisant des échantillons d'ADN, dans le but de tester l'amplification et le polymorphisme.



#### **1.2.4.1 Génération d'une collection de fragments d'ADN génomique**

##### **1.2.4.1.1 Restriction de l'ADN génomique de pigeonpea**

Dans un premier temps la restriction de l'ADN génomique par les enzymes de restriction HaeIII, RsaI et NheI a été réalisée. A cet effet, un mélange de 600 µl a été réalisé avec : 200 µl d'ADN génomique (concentration finale 100 ng/µl), 60 µl de tampon NEB2 (10x) (concentration finale 1x), 20 µl de HaeIII 10 U/µl (BioLabs #RO108S) (concentration finale 200U), 20µl de RsaI 10U/µl (BioLabs #RO167S) (concentration finale 200 U), 20 µl de NheI 10 U/µl (BioLabs #RO131S) (concentration finale 200 U). Le mélange a été passé par vortex et centrifugé légèrement, ensuite réparti en 6 tubes et incubé à 37°C toute la nuit.

L'ADN a été digéré par le cocktail d'enzymes de restriction pour produire des fragments de taille < 1000 pb. Les deux enzymes de restriction HaeIII et RsaI génèrent directement des bouts francs. Par contre l'enzyme NheI produit des bouts cohésifs.

##### **1.2.4.1.2 Traitement à la nucléase et à la phosphatase alcaline**

Le traitement à la nucléase a permis d'obtenir des fragments à bouts francs. A cet effet, les 6 tubes ont été rassemblés en un seul et incubés à 65°C pendant 20 minutes pour inactiver les enzymes de restriction. Ensuite, 5 µl de *Mung bean Nucléase* (50U) (BioLabs #M0250S) ont été ajoutés directement à l'échantillon et incubés pendant 30 minutes à 30°C. Finalement, les fragments d'ADN ont été purifiés à l'aide du kit « microcon, Centrifugal Filter Devices » (Millipore #42413), conformément aux instructions du fabriquant.

Le traitement à la phosphatase alcaline permet de retirer les groupements phosphates à l'extrémité 5' des fragments d'ADN. Cette étape facilite la ligation des adaptateurs car elle empêche les fragments de se lier entre eux. A cet effet un mélange de 300 µl a été réalisé avec : 125 µl de ADN, 30 µl de tampon CIAP(10x) (NEB2) (concentration finale 1x), 140 µl de H<sub>2</sub>O, 5 µl de Phosphatase (BioLabs #MO 290S) (concentration finale 50 U), le mélange a été incubé pendant 2h à 37°C. Ensuite les fragments d'ADN ont été purifiés à l'aide du kit « microcon, Centrifugal Filter Devices » (Millipore #42413), conformément aux instructions du fabriquant.

##### **1.2.4.1.3 Récupération des fragments d'ADN entre 400 et 900pb avec le Kit QiaExII**

Les fragments compris entre 400 et 1000 pb ont été récupérés (QiaExII, ref 20021) après électrophorèse sur gel d'agarose. Après électrophorèse, un morceau de gel contenant le fragment d'ADN à purifier a été coupé à l'aide d'une lame scalpel stérile.

Les fragments trop grands ne permettent pas de séquencer la totalité du fragment en une fois et, à l'opposé, les fragments de trop petite

taille laissent trop peu de liberté pour la sélection d'amorces flanquantes. Un fragment grand avec un microsatellite à son extrémité pose problème lui aussi.

#### **1.2.4.1.4 Hybridation des amorces SNX pour former l'adaptateur double brin**

Pour l'hybridation, 100 µl de l'amorce SNX reverse et 100 µl de l'amorce SNX forward (100 µM chacune) ont été mélangés dans un tube de manière à avoir une concentration finale en adaptateur double brin de 50 µM. Ensuite, le tube a été placé dans un Erlen de 1L contenant de l'eau en ébullition et incubé pendant 10 minutes. Finalement le tube a été refroidi lentement jusqu'à température ambiante.

#### **1.2.4.1.5 Ligation des fragments d'ADN avec des adaptateurs**

Des adaptateurs particuliers appelés SNX ont été ligués à bouts droits. La ligation a été faite en présence d'enzyme XmnI qui restreint les sites formés par auto-ligation de l'adaptateur, sans toucher aux ligations adaptateurs-fragments d'ADN génomique. L'ajout de ces adaptateurs a pour but de permettre l'amplification après l'hybridation soustractive afin d'augmenter le nombre de fragments contenant un microsatellite.

A cet effet, la réaction de ligation-restriction a été préparée avec 40 µl d'ADN génomique, 6 µl de Linker SNX double brin (50 µM) (concentration finale 5µM), 12 µl de Tampon T4ligase (concentration finale 1x), 54,8 µl de H<sub>2</sub>O, 1,2 µl BSA (concentration finale 1x), 4 µl d'enzyme de restriction XmnI (Biolabs # R0194S) (80U), 2 µl de T4 DNA ligase (Biolabs # M0202s) (4000U).

La ligation a été faite pendant la nuit dans un appareil PCR avec profil de température de : 30 cycles définis comme suit : 30 min à 16°C et 10 min à 37°C. La ligation se termine par une inactivation des enzymes par un passage de 20 min à 65°C.

#### **1.2.4.1.6 Vérification de la ligation des adaptateurs par PCR**

La vérification de la ligation des adaptateurs a été réalisée par PCR. Pour ce faire, le mélange suivant a été préparé: 2 µl de produit de ligation, 36,5 µl de H<sub>2</sub>O, 5 µl de Tampon PCR (10x) (concentration finale 1x), dntp mix (10mM de chaque nucléotide (concentration finale de 0,2mM), SNX, 0,5 µl de Taq polymérase (5 U/ µl) (BioLabs # MO267L) (concentration finale 2,5 U/ µl).

L'amplification a été faite avec le profil de température suivant : 5 min à 95°C, ensuite, 30 cycles définis comme suit : 30 secondes à 95°C, 1min à 55°C, 1min à 72°C. L'amplification a été terminée par une élongation de 7 min à 72°C.

#### **1.2.4.2 Enrichissement de la banque génomique en séquences microsatellites**

##### **1.2.4.2.1 Hybridation soustractive**

Cette hybridation soustractive permet d'enrichir la banque en séquences microsatellites. Elle se réalise grâce à des sondes complémentaires des microsatellites recherchés, sondes liées à des billes magnétiques par le système biotine - streptavidine.

Les fragments d'ADN génomique contenant une séquence microsatellite ont été isolés par hybridation avec une sonde GA<sub>15</sub> biotinylé. Cette sonde a été préalablement couplée avec des billes magnétiques associées à la streptavidine. Un aimant a permis de récupérer les billes magnétiques ainsi que les fragments d'ADN associés à celles-ci.

Pour réaliser la fixation de l'oligo GA15-biotine à la streptavidine se trouvant à la surface des billes magnétiques, une solution de SSC 20x (NaCl 3M, Citrate de Na 0,3 M (FLUKA #71404), pH 7) a été préparée. A partir de cette solution les solutions : SSC 5x, SSC 2x, SSC 2x plus 0,1% SDS, SSC 1x, SSC 1x plus 0,1% SDS ont été faites.

Les billes ont été resuspendues et 100 µl ont été prélevés dans un Eppendorf. Les billes ont été lavées à trois reprises dans 150 µl de SSC 5x. Le SSC 5x a été retiré et le mélange suivant a été fait pour un volume de 200 µl : 6 µl de (GA)<sub>15</sub>-biotine 100µM (concentration finale 3µM), 1 mg de Streptavidine magnetic particles (Kit PolyA Tract mRNA Isolation System II # 25300, Promega), 50 µl de SSC 20x (concentration finale 5x) et 144 µl de H<sub>2</sub>O.

Ensuite, le mélange a été incubé 15 minutes à température ambiante sous agitation. L'excès d'oligomères non liés a été enlevé par 3 lavages avec 200 µl de milieu SSC 5x et un lavage de 70 µl de SSC 20x.

Dans le but d'hybrider l'oligo {GA}<sub>15</sub>-biotine aux fragments d'ADN après ligation des adaptateurs, 20 µl d'ADN<sub>gen</sub> ont été prélevés dans 110 µl d'eau et dénaturés pendant 10 minutes à 95°C. Ensuite, le tube a été mis directement sur glace.

Finalement les 70 µl de billes magnétiques ont été ajoutés à l'ADN dénaturé. L'hybridation a été réalisée pendant 45 minutes à 55°C. Ensuite, un lavage 2x avec 200 µl de SSC 2X a été réalisé, pendant 5 minutes à température ambiante.

##### **1.2.4.2.2 Elutions des séquences contenant les microsatellites**

En ajustant la stringence du lavage, les séquences contenant peu de régions microsatellites ont été éliminées. Pour les lavages suivants, on a veillé à garder constamment les Eppendorf dans l'eau à 62°C.

Les lavages ont été réalisés 4x avec 200 µl de SSC 2x, 0,1% SDS pendant 5 minutes à 62°C, ensuite, 4x avec 200 µl de SSC 1x, 0,1% SDS

pendant 5 minutes à 62°C, après 2x avec 200 µl de SSC 1x pendant 5 minutes à 62°C.

Pour éluer les fragments d'ADN génomique contenant des séquences microsatellites de type {GA}<sub>n</sub>, 40 µl d'une solution de NaOH (20 µl de NaOH 1N, 5 µl de NaCl 4M, 175 µl d'eau) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 20 minutes à température ambiante sous agitation. Ensuite, 20 µl d'HCl 0,2M et 4,4 µl de TE 10x (Tris 100 mM (pH 8) (ACROS ORGANICS # 140500025), EDTA 1 mM (SIGMA® # E-5134)) ont été ajoutés.

Après l'échantillon a été dessalé sur une colonne microcon (Millipore #42413) et élué avec 20 µl d'eau.

Pour réaliser l'enrichissement par PCR des fragments d'ADN génomique purifiés par hybridation avec un oligonucléotide biotinylé, le mélange suivant a été préparé, pour 50 µl : 5 µl de produit d'élution, 33,5 de H<sub>2</sub>O, 5 µl de Tampon PCR 10x (concentration finale 1x), 1 µl de DNTP mixture (10 mM de chaque nucléotide) (concentration finale 0,2 mM), 5 µl de SNX forward 10µM (concentration finale 1µM), 0,5 µl de Taq polymerase (5 U/ µl) (concentration finale 2,5 U).

L'amplification a été faite avec le profil de température suivant : 5 minutes à 95°C, ensuite, 40 cycles définis comme suit : 30" à 95°C, 1' à 55°C, 1' à 72°C. L'amplification a fini par une élévation de 7 minutes à 72°C.

#### **1.2.4.2.3 Insertion des fragments d'ADN gen enrichis en microsatellites dans le Vecteur pCR®II et transformation dans TOP10F'**

Voir les instructions du fabricant (TA Cloning<sup>R</sup> Kit Dual Promoteur, Invitrogen #K02060-40).

Le vecteur PCRII est un vecteur de type TA. Cela signifie que le T en 3' du vecteur s'hybride avec le A ajouté par la Taq polymerase lors de l'amplification des fragments d'ADN génomique. Le fragment s'insère dans le gène LacZ.

Les bactéries Top10F' possédant un fragment d'ADN génomique dans leur plasmide sont détectées par leur couleur blanche sur un milieu contenant du X-gal (le gène LacZ est inactif).

#### **1.2.4.2.4 Criblage des clones positifs par sonde froide**

Dans cette étape les clones contenant des séquences SSR ont été isolés. L'ADN des colonies bactériennes transformées (blanches) a été transféré sur une membrane de nylon Hybond<sup>TM</sup>. L'emplacement des clones contenant une séquence microsatellite a été détecté grâce à la fixation d'une sonde GA<sub>15</sub> biotinylé au microsatellite GA/CT. Cette sonde a été fixée à son tour à la streptavidine elle-même couplée à la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline dégrade un substrat chémiluminescent (CSPD), ce qui provoque l'émission de photons qui marquent un film autoradiographique.

Le repiquage de clones a été réalisé sur boîte de Pétrie contenant un milieu LB additionné d'ampicilline sur une matrice quadrillé avec 50 ou 100 emplacements. Chaque clone blanc a été repiqué à l'aide de tips stériles sous hotte à flux laminaire. Après repiquage, la boîte a été incubée environ 16 heures à 37°C.

Ensuite, le transfert de l'ADN des clones sur membrane a été fait. Les membranes (Hybond<sup>TM</sup>-N+, Amersham #RPN203B) ont deux faces distinctes : le choix de la face est indifférent pour le transfert lui-même. Les membranes doivent être manipulées avec des gants et des pinces.

Avant le transfert de l'ADN des clones sur membranes de nylon, celles-ci ont été numérotées conformément aux numéros des boîtes. Elles ont été transférées et orientées à l'aide d'un système à trois points.

Chaque membrane a été déposée sur la boîte de pétri (marquage sur la face supérieur) pendant 5-10 minutes. Pour améliorer le transfert des bactéries sur la membrane, un étaloir a été passé délicatement à bactérie sur la membrane déposée.

3-4 feuilles de papier Whatman 3M ont été imbibées avec la solution de lyse des bactéries et de dénaturation de l'ADN (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) jusqu'à saturation.

Les membranes ont été retirées délicatement des boîtes pétri à l'aide d'une pince souple, puis elles ont été transférées sur le Whatman imbibé de solution (face bactéries à l'air), ensuite et les membranes ont été mises au repos pendant 10 minutes.

3-4 feuilles de papier Whatman 3M ont été imbibées avec la solution de neutralisation (Tris HCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 1,5 M) jusqu'à saturation. Ensuite les membranes ont été transférées à l'aide d'une pince plate sur ces feuilles (face bactéries à l'air), et elles ont été mises au repos pendant 10 minutes.

3-4 feuilles de papier Whatman 3M avec la solution de SSC2x (NaCl 300 mM, citrate de NA 30 mM, pH 7) ont été imbibées aussi jusqu'à saturation. Ensuite les membranes ont été transférées à l'aide d'une pince plate sur ces feuilles (face bactéries à l'air) et on les y a laissé 5 minutes.

Les membranes ont été récupérées sur des feuilles de papier Whatman sec (face bactéries à l'air), ensuite elles ont été incubées au four pendant 1 heure à 80°C pour fixer l'ADN.

Pour le criblage par hybridation sur membrane, les solutions suivantes ont été préparées:

SDS 10% (10 ml) : 1 ml de SDS, 9 ml d'eau.

SSC 20x (0.5l) : 50,25gr de trisodium citrate déshydraté (FLUKA #71404), 87,65gr de NaCl.

Solution de rinçage R1 (1L) : 100 ml de SSC 20x (SSC 2x), 1 ml de SDS (0,1%), 899 ml d'eau.

Solution de rinçage R2 (1L) : 50 ml de SSC 20x (SSC 1x), 1 ml de SDS (0,1%), 949 ml d'eau.

Tampon de lavage (1l) : 13,81 gr d'acide maléique (0,1 M) (Fulka #63190), 8,76gr de NaCl (0,15 M), Ajusté à pH 7,5, 3 ml de Tween 20 (0,3% v/v)(Fulka #93773).

Tampon T2 (1l) : Même chose que tampon T1 sans Tween 20.

Tampon de détection (1l) : Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, Ajusté à pH 9,5.

Solution stock de blocage : (Préparée la veille). 10 gr de Blocking reagent (produit du kit Biotin Detection : Roche – # 1 811 592) dans 100 ml de tampon T2, chauffée au micro-ondes et autoclavée.

Tampon d'hybridation (100 ml) : 25 ml de SSC 20x, 10 ml de solution stock de blocage, 200 µl de SDS 10%, 100 mg de N-Lauroylsarkosine (Sigma® # L-9150), 65 ml d'eau.

Solution de blocage 5x (80 ml) : Préparée fraîche 40 ml de solution stock de blocage, 40 ml de tampon T2.

Solution de streptavidine-AP : Préparée fraîche. 20 ml de solution de blocage 5x, 4 µl de streptavidine-AP (produit du kit Biotin Detection : Roche - référence : 1811592). La centrifugation a été réalisée pendant 10 minutes à 4000 rpm avant chaque usage, la quantité nécessaire a été prélevée.

Les membranes ont été placées face bactéries à l'air, dans un tube à hybridation (2 membranes par tube).

Pour l'**étape de déprotéination** 50 ml par tube de solution R1 ont été préparés avec 500 µl de protéinase K (Sigma® #P-2308) à 20 mg/ml. Les membranes ont été incubées pendant 50 minutes à 45°C.

Le **rinçage** a été réalisé 2x pendant 10 min à 45°C dans 50 ml de solution R1.

La **pré-hybridation** a été réalisée pendant 2 heures à température d'hybridation (55°C) dans 50 ml de tampon d'hybridation.

L'hybridation a été faite pendant 10 à 16 heures (une nuit) à 55°C, dans 10 ml de tampon d'hybridation dans lesquels 1 µl de mix de sonde marquée à la biotine a été ajouté.

Les **rinçages** ont été faits 2x pendant 12 minutes à 55°C dans 50 ml de solution R1, 2x 10 minutes à 55°C dans 50 ml de solution R2, 5 minutes à 55°C dans 50 ml de tampon de lavage T1.

Le **blocage** des sites spécifiques a été réalisé en laissant 30 minutes à température ambiante dans 35 ml de solution de blocage.

L'**incubation** dans la solution de streptavidine-AP a été faite pendant 30 minutes à température ambiante dans 20 ml de solution streptavidine-AP.

Les rinçages ont été faits 2x pendant 15 minutes à température ambiante dans 100 ml de tampon de lavage T1, 5 minutes à température ambiante dans 20 ml de tampon de détection.

L'étape de **détection** chimioluminescente a été faite en plaçant les membranes sur un film plastique recouvert avec environ 2 ml de CSPD ready-to-use (produit du kit Biotin Detection : Roche – #1 811 592). L'incubation pendant 5 minutes à température ambiante a été réalisée.

L'excès de liquide a été éliminé et les membranes ont été placées sur un deuxième film enfermant la membrane. Ensuite, les membranes ont été placées dans l'étuve à 37°C.

Finalement, les membranes ont été exposées pendant 2 minutes sur un film radiographique sensible à la lumière. Les clones positifs ont été repiqués.

#### 1.2.4.3 Séquençage des clones retenus

Les clones retenus ont été séquencés par PCR sur colonie à l'aide d'amorces universelles. Plus de 95% des clones sélectionnés après criblage contiennent un microsatellite.

##### 1.2.4.3.1 Isolement d'ADN plasmidique en grande série

La mise au point des conditions de cultures bactériennes et de purification de plasmide en plaque 96 puits a été réalisée.

Une miniprep a été réalisée afin d'extraire une petite quantité (100 ng à 5 µg) d'ADN sous forme de plasmide provenant de bactéries transformées.

D'abord les cellules ont été lysés par un détergent en milieu alcalin (SDS-NaOH) afin de libérer l'ADN génomique et plasmidique. L'ADN génomique et les protéines ont été précipités à l'acétate de sodium. Le précipité a été séparé par centrifugation, le surnageant contenait l'ADN plasmidique. Celui-ci a été précipité avec l'éthanol à 95% et lavé avec l'éthanol à 70% pour dissoudre les sels et restaurer les propriétés physico-chimiques de l'ADN.

L'ADN a été précipité avec 2 volumes d'éthanol d'un volume d'Isopropanol après l'ajout de cations qui neutralisent les charges négatives de la molécule.

La miniprep a été réalisée en 4 jours. Le premier jour au matin, les bactéries transformées ont été repiquées sur milieu solide et on les a laissées à 37°C pendant 24h. Les solutions suivantes ont été préparées :

200 ml de **Tampon P1** (stocké à 4°C) : 20 mg de Rnase A (100 g/ml), 1,2114 gr de Tris HCl (50 mM pH 8,0), 0,744 gr d'EDTA (10 mM) SIGMA® # E-5134).

200 ml de **Tampon P2** (stocké à température ambiante) : 1,6 gr de NaOH (200 mM), 2gr de SDS 1% (P/V).

200 ml de **Tampon P3** (stocké à 4°C) : 58,89 gr de Kac 3.0 M pH 5,5 (Sigma #P-5708).

Le deuxième jour, une plaque multipuits destinée aux cultures liquides de bactéries a été préparée sous hotte ; on y a ajouté 1,2 ml de milieu «CIRCLE GROW» (Q-BIO gene #3000-112) contenant de l'ampicilline (100 ng/ ml). Dans chaque puit un clone en phase exponentielle repiqué la veille a été transféré et la plaque a été mise à 37°C sous agitation (190 rpm).

Le troisième jour, un stock glycérol des transformants a été préparé à partir de la culture liquide. 120 µl de glycérol 40% ont été mis dans chaque puit, d'une plaque de 96 puits et 120 µl de culture liquide ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été stockée à -70°C.

La centrifugation (Refrigerated Centrifuge PK120R, ALC) du reste de la culture liquide a été faite pendant 10 minutes à 3500 rpm. Après avoir retiré le surnageant, 300 µl de tampon de lyse (tampon P1) ont été ajoutés et homogénéisés. L'incubation a été faite pendant 10 minutes et 300 µl de tampon P2 (tampon de lyse) ont été ajoutés et homogénéisés.

Ensuite, l'incubation pendant 10 min a été faite et 300 µl de tampon P3 (précipitation des protéines) ont été ajoutés, puis une incubation de 30 minutes et une centrifugation pendant une heure à 3500 rpm a été réalisée.

Une plaque multiscreen (Millipore #MAGVN2210) a été placée dans une nouvelle plaque multipuits, servant de filtre ne laissant pas passer les protéines.

200 µl de la première plaque ont été mis dans les filtres multiscreen et une centrifugation de 3 minutes à 1000 rpm a été réalisée. Cette opération a été faite 2 fois.

800 µl d'isopropanol ont été ajoutés dans la deuxième plaque multipuits et incubés 30 minutes à température ambiante. Finalement une centrifugation pendant 1h30 à 3500 rpm a été faite.

L'isopropanol a été enlevé. Un lavage avec 500 µl d'éthanol 70% centrifugé a été réalisé. Le tube a été séché pendant une nuit à 37°C afin que tout l'éthanol s'évapore.

Le troisième jour, 25 µl d'eau ont été ajoutés dans chaque puits, centrifugé 30 secondes et laissé 1h sous agitation. Finalement le stockage a été réalisé dans une plaque multipuits à -20°C.

#### **1.2.4.3.2 Séquençage des clones**

Un mélange contenant 1 µl d'amorce (10 pmoles / µl), 1 µl d'ADN a été préparé et le volume a été ajusté à 10 µl avec de l'eau stérile sans DEPC. Le mélange a été dénaturé à 95 °C pendant 15 minutes puis a été mis immédiatement sur glace pendant 3 minutes.

Quatre µl de CEQ DTCS quik start kit (Beckman #608120) ont été ajoutés, 1 µl de CEQ Sequencing reaction buffer kit (Beckman #608074) et 5 µl d'eau milliQ. Ensuite, la réaction de séquençage a été lancée avec le



programme suivant : 1'30" à 92°C, 40 cycles définis comme suit : 20" à 96°C, 20" à 50°C, 4' à 60°C. Le programme s'est terminé par 4°C à l'infini.

Ensuite, le produit PCR a été purifié en ajoutant aux 20 µl de solution de séquençage 60 µl d'éthanol 96% froid et 5 µl de Stop solution composés par : 1 µl de glycogène (Roche #901303), 2 µl de d'acétate de sodium 3M (sigma #S-7899), 1,6 µl d'eau et 0,4 µl d'EDTA 0,5 M (sigma #E-7889).

La centrifugation pendant 15 minutes à 13 000 g a été réalisée puis le surnageant éliminé. Ensuite, un lavage avec 200 µl d'éthanol 76% et une centrifugation pendant 15 minutes à 13 000 g ont été réalisés, le surnageant a été éliminé par la suite. Cette étape a été réalisée une seconde fois.

Le séchage a été réalisé au speedvac pendant 25 minutes. Ensuite, la suspension dans 40 µl de SLS CEQ (Beckman #608082) a été réalisée et placée dans un puit de la plaque et a été couverte avec une goutte d'huile minérale.

Dans une nouvelle plaque, 8 gouttes de CEQ sequencing separation buffer (Beckman #608012) ont été mises dans chaque puits. Un Séquenceur Beckman CEQ 8000 a été employé en utilisant la méthode de séparation LFR-a (CEQ 8000 Genetic analysis system) et dont les paramètres sont repris ci-dessous : température des capillaires lors de la migration : 50°C ; température de dénaturation : 90°C durée : 120 secondes ; injection : voltage 2 kV, durée 15 secondes ; séparation : voltage 4 kV, durée 110 minutes.

L'analyse des séquences a été réalisée avec les paramètres par défaut.

#### 1.2.4.4 Définition des amorces

Les séquences forward et reverse des clones positifs ont été introduites dans le programme « Vector NTI ». Pour chaque séquence, la séquence du vecteur, la séquence de l'adaptateur SNX, les séquences au delà de 500 pb ont été enlevées. Les séquences forward et reverse de chaque clone positif ont été assemblées et les erreurs de séquençage ont été corrigées.

La séquence finale a été intégrée dans le programme «Primer3». (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 WWW.cgi>) dont les paramètres suivants ont été sélectionnés : Primer size : 18<20<27, Primer Tm: 57<60<63, Primer GC% : 40<50<60, Number to return : 10.

Douze amorces forward et reverse ont été proposées. Le  $\Delta G$  pour la formation d'hairpins a été calculé ainsi que de duplex pour chaque amorce à l'aide du logiciel « Oligo ». Finalement, les amorces ayant le  $\Delta G$  le moins négatif ont été sélectionnées, les amorces ont été commandées chez Eurogentec.

#### 1.2.4.5 Optimisation des conditions d'amplification pour chaque paire d'amorce

Une fois les amorces définies et sélectionnées, la mise au point des conditions d'amplification a été réalisé. Pour cela, un gradient de température d'hybridation a été utilisé. Pour chaque amorce, une amplification avec des températures d'hybridation différentes allant de 55 à 65°C a été réalisée. 7 de 12 amorces ont été amplifiées à 57,5°C ainsi qu'à 57°C mais afin d'éviter les amplifications non spécifiques la température d'hybridation la plus élevée a été choisie.

Pour chaque amorce, 8 mélanges PCR de 50 µl ont été réalisés. Chaque mélange contenait : 1 µl de ADNg, 40,6 µl d' H<sub>2</sub>O, 5 µl de Tampon PCR 10x (concentration finale 1x), 1 µl de DNTP mixture (10 mM de chaque nucléotide) (concentration finale 0,2 mM), 1 µl d'amorce FW (concentration finale 1µM), 1 µl d'amorce RV (concentration finale 1µM) et 0,5 µl de Taq polymerase (5 U/ µl) (concentration finale 2,5 U).

L'amplification a été faite dans l'appareil PCR (iCycler thermal cycler, Biorad) avec le profil de température suivante : 4 minutes à 95°C, ensuite, 35 cycles définis comme suit : 30" à 95°C, 30" de 55°C à 65°C (gradient de température : 65°C, 64,3°C, 63,1°C, 61,2°C, 58,7°C, 57°C, 55,8°C et 55°C.), 1' à 75°C. L'amplification a été finie par une élongation de 7 minutes à 75°C.

La migration des 8 produits PCR a été faite sur gel d'acrylamide 12%. Les plaques sur les portoirs prévus à cet effet ont été placées. La solution suivante a été préparée :

**Solution de séparation:** 1,6 ml d'eau, 2 ml d'acrylamide 30% (BioRad # 161-0158), 1,3 ml de tris pH 8,8, 0,05 ml d'APS 10% (Chimica # 2015374), 2 µl de TEMED (Sigma #T-8133).

La solution a été coulée entre deux plaques en laissant 1,5 cm au sommet et le remplissage d'éthanol jusqu'au bord a été réalisé. La polymérisation a été faite en environ 20 minutes. Ensuite, l'éthanol a été absorbé à l'aide d'un papier Watmann, les peignes ont été placés ultérieurement. La solution suivante a été préparée :

**Solution d'empilement:** 2,7 ml d'eau, 670 µl d'acrylamide 30% (BioRad # 161-0158), 500 µl de tris pH 8,8, 40 µl d'APS 10% (Chimica # 2015374), 10 µl de TEMED (Sigma #T-8133).

La solution a été coulée entre les deux plaques jusqu'au bord supérieur et polymérisée pendant environ 10 minutes.

Les plaques ont été placées dans la cuve remplie celle-ci de tampon TAE 1x. Ensuite, les peignes ont été retirés et les puits ont été chargés. Les plaques ont été migrées pendant 1 heure (courant de 150 mV).

Après migration, les plaques ont été séparées et le gel a été mis délicatement dans un bac contenant environ 100 ml de TAE 1x et 5 µl de BET. Après 30 minutes, une photo sous UV a été prise.

La température optimale d'hybridation pour l'amorce a été déterminée, c'est-à-dire la température pour laquelle l'amplification a été maximale.

#### **1.2.4.6 Vérification du polymorphisme des microsatellites retenus**

Une fois que les mises au point des amplifications ont été terminées, les amorces montrant le plus de polymorphisme ont été sélectionnées. Dix ADN différents ont donc été amplifiés avec les 7 amorces.

25 µl du mélange suivant ont été préparés pour chaque PCR : 0,5 µl d'ADN gén, 20,3 µl d'H<sub>2</sub>O, 2,5 µl de Tampon PCR 10x (concentration finale 1x), 0,5 µl de DNTP mixture (10 mM de chaque nucléotide) (concentration finale 0,2 mM), 0,5 µl d'amorce FW (concentration finale 1µM), 0,5 µl d'amorce RV (concentration finale 1µM), 0,2 µl de Taq polymérase (5 U/ µl) (concentration finale 2,5 U).

La migration des produits PCR sur gel d'acrylamide 12% a été faite. Les amorces ayant le plus de variabilité pour la bande correspondante à la taille attendue ont été sélectionnées. Les amorces sélectionnées couplées avec un fluorochrome ont été commandées.

#### **1.2.4.7 Détermination de la taille des allèles microsatellites**

L'amplification PCR a été faite pour chaque amorce fluorescente et pour chaque ADN purifié. A cet effet, un tube par ADN avec 25 µl du mélange suivant a été préparé:

0,5 µl de ADN gén, 20,3 d'H<sub>2</sub>O, 2,5 µl de Tampon PCR 10x (concentration finale 1x), 0,5 µl de DNTP mixture (10 mM de chaque nucléotide) (concentration finale 0,2 mM), 0,5 µl d'amorce FW (concentration finale 1µM), 0,5 µl d'amorce RV (concentration finale 1µM), 0,2 µl de Taq polymérase (5 U/ µl) (concentration finale 2,5 U).

L'amplification a été faite dans l'appareil PCR (iCycler thermal cycler, Biorad) avec le profil de température suivant : 4 minutes à 95°C, ensuite, 35 cycles définis comme suit : 30" à 95°C, 30" de 55°C à 65°C (gradient de température : 65°C, 64,3°C, 63,1°C, 61,2°C, 58,7°C, 57°C, 55,8°C et 55°C.), 1' à 75°C. L'amplification a été finie par une élongation de 7 minutes à 75°C.

Pour l'analyse des fragments, le séquenceur Beckman CEQ 8000 a été utilisé. 2,5 µl de standard de taille ont été ajoutés (CEQ Beckman Coulter #608090) dans 340 µl de SLS (CEQ Sample loading solution, Beckman #608082). Ensuite, dans chaque compartiment d'une plaque multipuit, le mélange suivant a été ajouté : 40 µl de SLS (avec le standard de taille) et de 2 à 4 µl de produit PCR. Ensuite, 1 goutte d'huile minérale a été ajoutée dans chaque puit (CEQ Beckman Coulter #608114). Dans chaque puit d'une autre plaque, 8 gouttes de tampon de séparation (SEQ sequencing separation buffer, Beckman #608012) ont été incorporées. Après analyse, la taille et le nombre d'allèles différents ont été répertoriés.

## 2. Matériel et méthodes relatifs à la caractérisation moléculaire d'une collection de pigeonpea

Dans cette partie nous présenterons le matériel et les méthodes utilisées lors de la caractérisation moléculaire, l'analyse de la diversité et de la structure des populations de la collection de *pigeonpea*.

### 2.1 Matériel végétal

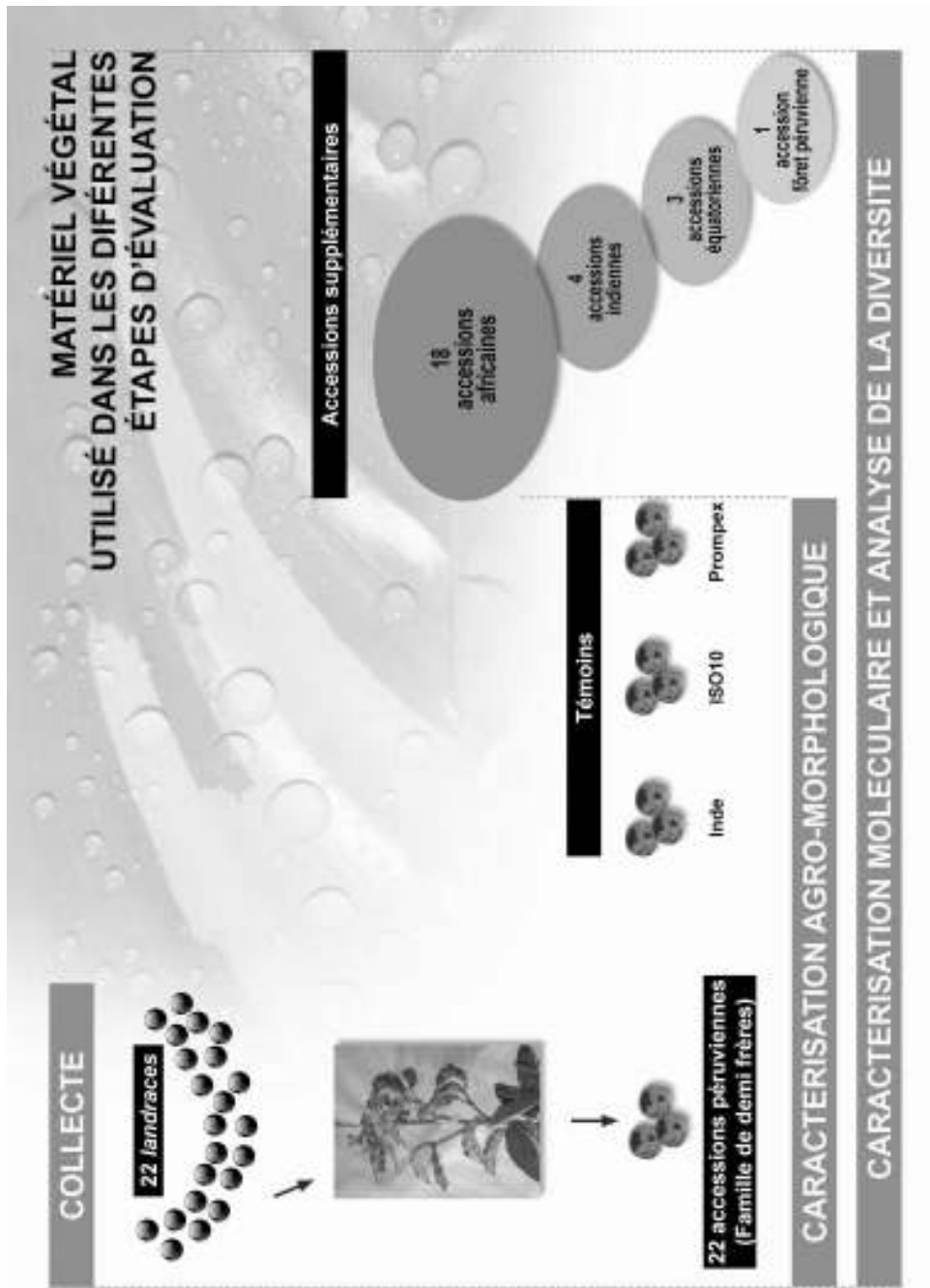
**51 accessions** de *pigeonpea* ont été analysées, soit : 25 accessions déjà utilisées dans la caractérisation agro-morphologique (Chapitre 2) (**tableau 33-A**) et 26 accessions supplémentaires (**tableau 33-B**).

**Tableau 33-A** : Matériel végétal utilisé lors de la caractérisation moléculaire. Accessions (Familles de demi-frères dérivés des *landraces*).

<b>ACCESSIONS (Familles de demi-frères dérivés des <i>landraces</i>)</b>			
<b>N°</b>	<b>Accession</b>	<b>Origine</b>	<b>N inv</b>
<b>1</b>	Illimo1	Pérou	<b>5</b>
<b>2</b>	Illimo2	Pérou	<b>5</b>
<b>3</b>	Illimo4	Pérou	<b>5</b>
<b>4</b>	Morrope9	Pérou	<b>5</b>
<b>5</b>	Morrope11	Pérou	<b>5</b>
<b>6</b>	Morrope12	Pérou	<b>5</b>
<b>7</b>	Morrope22	Pérou	<b>5</b>
<b>8</b>	Morrope 28	Pérou	<b>5</b>
<b>9</b>	Morrope 30	Pérou	<b>5</b>
<b>10</b>	Morrope 34	Pérou	<b>5</b>
<b>11</b>	Morrope 37	Pérou	<b>5</b>
<b>12</b>	Jayanca 23	Pérou	<b>5</b>
<b>13</b>	Jayanca 24	Pérou	<b>5</b>
<b>14</b>	Jayanca 26	Pérou	<b>5</b>
<b>15</b>	Motupe 40	Pérou	<b>5</b>
<b>16</b>	Motupe 44	Pérou	<b>5</b>
<b>17</b>	Motupe 45	Pérou	<b>5</b>
<b>18</b>	Olmos 47	Pérou	<b>5</b>
<b>19</b>	Olmos 48	Pérou	<b>5</b>
<b>20</b>	Olmos 49	Pérou	<b>5</b>
<b>21</b>	Olmos 52	Pérou	<b>5</b>
<b>22</b>	Olmos 54	Pérou	<b>5</b>
<b>23</b>	ISO 10	améliorée	<b>5</b>
<b>24</b>	Prompex2000	améliorée	<b>5</b>
<b>25</b>	ICPL 94008	Inde	<b>5</b>
<b>Total</b>		<b>25 accessions</b>	<b>125</b>

**Tableau 33-B :** Matériel végétal utilisé lors de la caractérisation moléculaire. Accessions supplémentaires d'origine indienne, africaine, équatorienne, forêt péruvienne).

<b>Accessions supplémentaires d'origine indienne, africaine, équatorienne, forêt péruvienne)</b>			
<b>N°</b>	<b>Accession</b>	<b>Origine</b>	<b>N inv</b>
<b>26</b>	Manak 120	Inde	<b>2</b>
<b>27</b>	ICPL 90008	Inde	<b>5</b>
<b>28</b>	ICPL 94058	Inde	<b>5</b>
<b>29</b>	ICPL 88027	Inde	<b>5</b>
<b>30</b>	ICP 15346	Uganda	<b>5</b>
<b>31</b>	ICP 15533	Uganda	<b>5</b>
<b>32</b>	ICP 15512	Uganda	<b>5</b>
<b>33</b>	ICP 14586	Zambie	<b>3</b>
<b>34</b>	ICP 14584	Zambie	<b>5</b>
<b>35</b>	ICP 14257	Zambie	<b>5</b>
<b>36</b>	ICP 13275	Kenya	<b>4</b>
<b>37</b>	ICP 13271	Kenya	<b>5</b>
<b>38</b>	ICP 13613	Kenya	<b>5</b>
<b>39</b>	ICP 13325	Malawi	<b>3</b>
<b>40</b>	ICP 13378	Malawi	<b>5</b>
<b>41</b>	ICP 13422	Malawi	<b>5</b>
<b>42</b>	ICP 13644	Afrique du sud	<b>5</b>
<b>43</b>	ICP 12793	Tanzanie	<b>5</b>
<b>44</b>	ICP 12073	Tanzanie	<b>5</b>
<b>45</b>	ICP 12093	Tanzanie	<b>5</b>
<b>46</b>	ICP 12009	Tanzanie	<b>5</b>
<b>47</b>	ICP 12028	Tanzanie	<b>5</b>
<b>48</b>	Guayaquil20	Equateur	<b>5</b>
<b>49</b>	Guayaquil22	Equateur	<b>5</b>
<b>50</b>	Guayaquil23	Equateur	<b>5</b>
<b>51</b>	Var San Francisco	Forêt du Pérou	<b>5</b>
<b>Total</b>			<b>122</b>
<b>Total 51 accessions</b>			<b>247</b>



**Figure 69 :** Schéma explicatif du matériel végétal utilisé dans les différentes étapes d'évaluation.

Concernant l'origine des **25 accessions** qui ont déjà été utilisées dans la caractérisation agro morphologique (Chapitre 2), nous retrouvons :

**22 accessions péruviennes** : chacune est une famille de demi-frères. Formés par les grains récoltés de chacune de 22 *landraces* collectées lors de la prospection et collecte (Chapitre 1).

**2 variétés améliorées** : ISO10 et Prompex2000.

- **ISO10** : Variété améliorée produite par l'IPEL (Institut de légumineuses de grains). Forme de la sélection masal d'une variété ancienne « INIA Sipan ».
- **Prompex2000** : Variété améliorée produite par l'IPEL (Institut de légumineuses de grains). Forme de polycroissement de variétés africaines et indiennes.

**1 variété indienne** : ICPL 94008, fourni par l'ICRISAT.

Concernant l'origine des **26 accessions** supplémentaires nous retrouvons :

**18 accessions d'origine africaine** fournies par l'ICRISAT : Uganda (3), Zambie (3), Kenya (3), Malawi (3), Afrique du sud (1), Tanzanie (5)

**4 accessions d'origine indienne** de la banque de germoplasme du Programme de Légumineuses de l'UNALM, Lima, Pérou

**3 accessions d'origine équatorienne** : accessions dérivées de sélection de familles de la variété « Guayaquil », provenant de la banque de germoplasme du Programme de Légumineuses de l'UNALM, Lima, Pérou.

Une méthode de sélection massale a été employée. Ces accessions ont été recombinaisonnées avec des lignées indiennes dans un champ de recombinaison en présence de pollinisateurs pour augmenter la pollinisation croisée : le *pigeonpea* est autogame mais avec jusqu'à 20% d'allogamie.

**1 accession de la forêt péruvienne** : variété locale provenant de la banque de germoplasme du Programme de Légumineuses de l'UNALM, Lima, Pérou.

En conclusion, le matériel végétal appartient à 7 groupes d'origines différents : péruvien, indien, africain, équatorien, forêt péruvienne, variétés améliorées (Prompex2000 et ISO10). Certains d'eux sont peu représentés comme les groupes indien, équatorien, de la forêt et celui des variétés améliorées.

## 2.2 Amorces utilisées

Au total 49 paires d'amorces ont été utilisées (**tableau 34**). Tout d'abord les 7 paires d'amorces microsatellites isolées dans le point 3-1. De plus, 9 paires d'amorces microsatellites de Burns (2001) ont été testées : CCB10, CCB9, CCB8, CCB7, CCB6, CCB5, CCB4, CCB2 et CCB1. De la même façon 8 paires d'amorces déterminées des séquences de *Cajanus* disponibles dans la base de données NCBI ont été utilisées (Odeny, 2007), aussi que 25 paires d'amorces fournies par l'ICRISAT.

Dans des tests préliminaires, seulement 19 amorces ont été retenues et évaluées pour leur polymorphisme. Les séquences des amorces utilisées sont montrées au **tableau 35**.

**Tableau 34** : Amorces microsatellites utilisées.

Amorces Utilisées	Source
7 paires d'amorces SSR isolées.	Sous-chapitre 3-1
9 paires d'amorces de la littérature.	Burns 2000
8 paires d'amorces déterminées des séquences de <i>cajanus</i> disponibles dans la base données NCBI.	Base de données NCBI
25 paires d'amorces fournis par l'ICRISAT.	ICRISAT
Total : 49 amorces utilisées	

## 2.3 Méthodes

### 2.2.1 Prélèvement de l'ADN phytoPASS

*PhytoPASS* (DNALis sprl, Gembloux, Belgique) est un kit de prélèvement d'ADN. Des travaux précédents ont montré la capacité d'employer le système de *phytoPASS* pour prélever l'ADN de manioc (Busogoro *et al.*, 2008).

Dans notre étude, les échantillons de 125 plantes du champ expérimental à Molina ont été rassemblés (Lima, Pérou). 5 plantes de chacune des 25 accessions du *pigeonpea*. Le kit de prélèvement de *phytoPASS* (sprl de DNALis) a été employé pour rassembler, stocker et transporter les matériaux de *pigeonpea* prélevés. Le prélèvement a été effectué en grattant la membrane abrasive de *phytoPASS* sur la surface de feuille de chaque plante choisie. Après échantillonnage, chacun des échantillons *phytoPASS* a été annoté et placé individuellement dans une pochette de papier. Le transport au laboratoire (FUNDP Namur Belgique) pour les analyses moléculaires a été effectué à température ambiante par la Poste.



Les échantillons des 26 accessions complémentaires qui ont été aussi caractérisées, ont d'abord été semés dans des pots de terre au laboratoire de l'URBV. Lorsque les plantules ont eu 1 mois, nous avons procédé au prélèvement de l'ADN à l'aide du kit *phytoPASS*.

**Tableau 35** : Séquences des amorces utilisées.

N	Locus	Sequence des Amorces	Rep	T°	Taille
1	ccga12	F : 5'-CCA-TAT-GCT-CAC-CCC-TAA-TTG-3' R : 5'-GTT-TCT-TGA-CGG-AAT-TGG-ATG-GTA-TGC-3'	(GA) <sub>38</sub>	58	217
2	ccga29	F : 5'-ATA-CGG-ACA-CGC-ACA-CAC-AT-3' R : 5'-GTT-TCT-TCC-CCT-ATC-TTC-AAA-GGC-AGA-3'	(GA) <sub>17</sub>	58	200
3	ccga44	F : 5'-ATC-TCC-GCC-TCA-CAC-TTG-AT-3' R : 5'-GTT-TCT-TGC-GAT-TCG-TCG-TCT-TCC-ATA-3'	(GA) <sub>40</sub>	58	244
4	ccga54	F : 5'-GGG-TTC-AGC-CAA-GAG-ATT-GA-3' R : 5'-GTT-TCT-TCC-ACT-TTC-ACA-CCA-CCA-C-3'	(GA) <sub>12</sub>	58	102
5	ccga81	F : 5'-AAA-ATA-TAC-TGA-GGG-AAG-TGA-A-3' R : 5'-GTT-TCT-TGA-AAC-TTG-GGC-AGA-ACC-TT-3'	(GA) <sub>5</sub> (GA) <sub>6</sub> (GA) <sub>6</sub> (GA) <sub>7</sub>	58	261
6	ccga87	F : 5'-TAG-CAC-CAT-TAT-CCC-CAT-CG-3' R : 5'-GTT-TCT-TCC-AAG-ATG-AGG-AGG-AAG-GTG-3'	(GA) <sub>160</sub>	58	469
7	ccga88	F : 5'-CTG-GGG-ATT-CTG-CGT-TTC-TA-3' R : 5'-GTT-TCT-TGG-GTG-GTC-AAG-AAT-TCA-CA-3'	(GA) <sub>21</sub>	58	229
8	CCB10	F : 5'-CAC-GAC-GTT-GTA-AAA-CGA-CCT-TCT-TAA-GGT-GAA-ATG-CAA-GC-3' R : 5'-GTG-TCT-TCA-TAA-CAA-TAA-AAG-ACC-TTG-AAT-GC-3'	(CA) <sub>15</sub>	50	244
9	CCB9	F : 5'-CAC-TTG-GTT-GGC-TCA-AGA-AC-3' R : 5'-GCC-AAT-GAA-CTC-ACA-TCC-TTC-3'	(CT) <sub>22</sub>	55	178
10	CCB8	F : 5'-TGC-GTT-TGT-AAG-CAT-TCT-TCA-3' R : 5'-ACT-TGA-GGC-TGA-ATG-GAT-TTG-3'	(CT) <sub>30</sub>	52	139
11	CCB7	F : 5'-CAA-CAT-TTG-GAC-TAA-AAA-CTG-3' R : 5'-AGG-TAT-CCA-ATA-TCC-AAC-TTG-3'	(CT) <sub>16</sub>	57	155
12	CCB6	F : 5'-ACA-ATG-CTA-GGG-AAC-ACC-GC-3' R : 5'-TAC-CTT-AAC-CCA-CAA-TGG-CC-3'	(CA) <sub>6</sub>	57	205
13	CCB5	F : 5'-GAC-AAT-TTT-GCA-TGC-ATT-GC-3' R : 5'-TTG-CAA-AAA-CAC-TTG-GTT-GG-3'	(CT) <sub>22</sub>	57	201
14	CCB4	F : 5'-CAC-GAC-GTT-GTA-AAA-CGA-CGG-AGC-TAT-GTT-GGA-GGA-TGA-3' R : 5'-GTG-TCT-TCC-TTT-TTG-CAT-GGG-TTG-TAT-3'	(CT) <sub>31</sub> imparfait	57	226
15	CCB2	F : 5'-CCA-TAA-TCC-AAT-CCA-AAT-CC-3' R : 5'-AGA-AGG-CTT-TCA-TGT-AAC-GC-3'	(CT) <sub>21</sub>	55	163
16	CCB1	F : 5'-CAC-GAC-GTT-GTA-AAA-CGA-CAA-GGG-TTG-TAT-CTC-CGC-GTG-3' R : 5'-GTG-TCT-TGC-AAA-GCA-GCA-ATC-ATT-TCG-3'	(CA) <sub>10</sub>	57	198
17	Pgm3	F : 5'-CAC-GAC-GTT-GTA-AAA-CGA-CAC-ACC-ACC-ATG-CTA-AAG-AAC-AG-3' R : 5'-GTG-TCT-TCC-AAG-CAA-GAC-ACG-AGT-AAT-CAT-3'	Inconnue ICRISAT	60- 55	180
18	Pgm6	F : 5'-CAC-GAC-GTT-GTA-AAA-CGA-CTG-CTT-CAA-GTT-GCC-TAC-CAG-3' R : 5'-GTG-TCT-TCA-AGG-GAG-GTG-GAC-TAC-AAA-3'	Inconnue ICRISAT	60- 55	190
19	Pgm64	F : 5'-CAC-GAC-GTT-GTA-AAA-CGA-CGT-GAG-TGA-GAG-TGA-GTG-TAT-TTG-TG-3' R : 5'-GTG-TCT-TGC-TCT-GAT-GCC-AAA-TGT-TGA-3'	Inconnue ICRISAT	60- 55	200

### 2.2.2 Extraction d'ADN

Le support *phytoPASS* a été placé dans un tube Falcon de 15 ml. 1 ml de Tampon Kaji (DNAIs) conservé à 4°C a été ajouté, agité au vortex pendant 30 secondes jusqu'à dépôt d'un lit de cristaux au fond du tube. Un repos de ce tube pendant 2 min à 4°C a été nécessaire.

300 µl de l'extrait a été pipeté. Ensuite 300 µl ont été transféré dans un eppendorf de 500 µl. Cet extrait brut clarifié a pu se conserver à une température de -20°C pendant plusieurs mois. L'extrait brut a été dilué 100 fois dans de l'eau distillée avant son utilisation en PCR.

### 2.2.3 Caractérisation de la collection de pigeonpea sur base de microsatellites

#### 2.2.3.1 Amplification PCR

Les réactions PCR pour un volume final de 25 µl ont été réalisées dans un thermocycler de type I Cyclor Bio Rad. A cet effet, le mélange suivant a été préparé : 2,5 µl d'ADN (*phytoPASS*), 0,25 µl de dntp mix (10 mM de chaque nucléotide, concentration finale de 0,2 mM), 2,5 µl de Tampon PCR (10x) (concentration finale 1x)+ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µl de Taq polymérase (5U/ µl) (concentration finale 2,5U/ µl) (Promega Ref. M830B), 1 µl d'Amorce 5' forward (10 µM) (concentration finale 10 pm/ µl), 1 µl d'Amorce 5' reverse (10 µM) (concentration finale 10 pm/ µl) et 17,55 µl d'eau milli-Q stérile.

L'amplification a été faite avec le profil de température suivante : 5 min à 95°C, ensuite, 35 cycles définis comme suit : 30 secondes à 95°C, 1 min à 54°C, 1 min à 72°C. L'amplification a été terminée par une élongation de 7 min à 72°C.

Chaque réaction d'amplification a été testée: 5 µl de produit PCR et 5 µl de bleu de bromophénol ont été mis à migrer par électrophorèse sur gel d'agarose 1% avec un marqueur de taille (Smart Ladder SF Ref. MW-1800-04, Eurogentec).

#### 2.2.3.2 Analyse des fragments sur séquenceur capillaire

Pour la détection des pics correspondant aux allèles, 2 à 3 µl du produit d'amplification ont été ajoutés à 38 µl de formamide (GenomeLab Sample Loading Solution SLS, Ref. 608082) avec un standard de taille de 400 pb ou 600pb ( Analis Ref. 608082, programme de migration : Frag4).

### 3. **Matériel et méthodes relatifs à l'analyse de la diversité et de la structure génétique d'une collection de pigeonpea**

#### 3.1 **Locus microsatellites**

Afin d'analyser la diversité et la structure génétique de la collection de *pigeonpea*, 7 locus microsatellites ont été retenus. Un locus (CCGA 54) isolé dans notre unité (URBV-FUNDP), cinq 5 locus (CC09, CC08, CC07, CCB4 et CC02) obtenues par Burns (2001) et un locus fourni par l'ICRISAT).

#### 3.2 **Base de données**

La base de données a été composée des tailles des allèles de 7 locus microsatellites retenus des 51 accessions de *pigeonpea* décrites dans le point (2.1) (25 accessions dans le cadre de l'étude agromorphologique et 26 accessions additionnelles). Au total, 6 groupes d'origine différentes ont été utilisés : 22 péruviennes, 18 africaines, 4 indiennes, 4 équatoriennes 2 variétés améliorées, 1 de la forêt péruvienne.

#### 3.3 **Analyses statistiques et logiciels utilisés**

Afin de réaliser l'analyse de la diversité et de la structure génétique de la collection de *pigeonpea* quatre aspects seront traités :

Premièrement, **l'analyse de la diversité des marqueurs**, le nombre et la taille d'allèles, l'indice de polymorphisme des loci **PIC** (Polymorphic Information Content) a été calculé, pour ce faire, on a utilisé la formule décrite par Saal et Wricke (1999).

Deuxièmement, **l'analyse de la diversité génétique intra-population**. Ainsi, pour chacun des groupes d'accessions de même origine, les paramètres de diversité intra-population ont été calculés: le pourcentage de loci polymorphes ( $P$ ), le nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ), le nombre efficace d'allèles ( $N_e$ ), l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ), l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ). De même, les fréquences alléliques ont été calculées à l'aide du logiciel GenAEx V6 (Peakall et Smouse, 2006).

Troisièmement, **l'analyse de la diversité génétique inter-population** : les paramètres de diversité inter-population comme : les statistiques de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ), le flux de gènes ( $N_m$ ) seront étudiés. De la même façon les indices de diversité de Nei ( $H_T$ ,  $H_S$ ,  $D_{ST}$ ,  $G_{ST}$ ) ont été calculés pour l'ensemble de chaque locus. Le logiciel POPGEN version 3.2 (Yeh et al. 1999) a été utilisé pour calculer les indices de diversité de Nei et le logiciel SPAGeDi (Hardy et Vekemans (2002) a été utilisé pour calculer les statistiques de Wright.

Afin d'établir les ressemblances et grouper les accessions, tout d'abord une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée à fin de visualiser le rapprochement entre les groupes d'accessions sans à priori. Le logiciel GENETIX 4.05.2 a permis de faire cette analyse.

Pour compléter cette approche, on a trouvé des ressemblances entre les accessions, basée sur la distance génétique entre groupes d'accessions d'origines différentes ainsi qu'entre les accessions péruviennes. La distance  $d_{\mu^2}$  a été utilisée, dans cette analyse, le degré d'éloignement tient compte de la différence de taille des allèles, ce qui correspond à l'hypothèse d'évolution de ce type de marqueurs utilisés. Le logiciel SPAGeDi (Hardy et Vekemans (2002) a été utilisé pour calculer les distances  $d_{\mu^2}$ . C'est un logiciel qui estime les distances génétiques entre accessions sur base des données de marqueurs génétiques co-dominants. Une fois la matrice obtenue, celle-ci a été copiée dans le Programme Phylip. Nous avons utilisé la méthode UPGMA (la route évolutive la plus courte). Celle-ci a généré un fichier arbre qui nous a permis de tracer un dendrogramme à l'aide du logiciel Draw Tree.

Lors d'utiliser le logiciel SPAGeDi (Hardy et Vekemans (2002), les paramètres suivants ont été sélectionnés :

**Niveau d'analyse :** (2) population.

**Statistiques :**

-basée sur l'identité des allèles : (1) **F-statistiques** globales et pairées.

-basée sur la taille des allèles : (6) **R-statistiques** globales et pairées.

**Option «computational» :** (3) Tests de permutation.

**Option « permutation » :** 5000.

**Options de sortie :** (3) présenter les matrices avec les coefficients génétiques pairées.

**Option sur le format des coefficients génétiques pairées :** (1) écrire en matrice.

Finalement l'**analyse de la structure génétique des populations**, l'analyse moléculaire de la variance pour les accessions de chaque groupe d'origines différentes a été réalisée par le logiciel GenAlEx V6 (Peakall et Smouse, 2006).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. *Obtention des marqueurs microsatellites chez le pigeonpea*

Dans cette partie, nous présenterons les résultats des étapes importantes d'obtention des marqueurs microsatellites chez le *pigeonpea*, comme l'enrichissement de la banque génomique, l'hybridation soustractive et le criblage de clones. De la même façon, l'efficacité de l'isolement des marqueurs microsatellites, les caractéristiques des marqueurs SSR et le polymorphisme des microsatellites chez *pigeonpea* seront également analysés.

#### 1.1 *Isolement des loci microsatellites chez le pigeonpea*

Les fragments d'ADN génomique contenant une séquence microsatellite ont été isolés par l'hybridation avec une sonde GA<sub>15</sub> biotinylée.

Au total, le protocole d'hybridation soustractive a été modifié trois fois. Les modifications ont été réalisées sur deux paramètres influençant la spécificité de l'enrichissement : la température et la concentration en sel. La spécificité de l'hybridation sera d'autant plus grande que la température est élevée. Cependant, à partir de la température de melting (T<sub>m</sub>) l'hybridation ne peut plus avoir lieu. La température intervient lors de l'hybridation et des lavages.

La spécificité de l'hybridation est d'autant plus grande que la concentration en sel est plus faible. Cette concentration est représentée par la concentration en SSC (SSC 1x : 150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium).

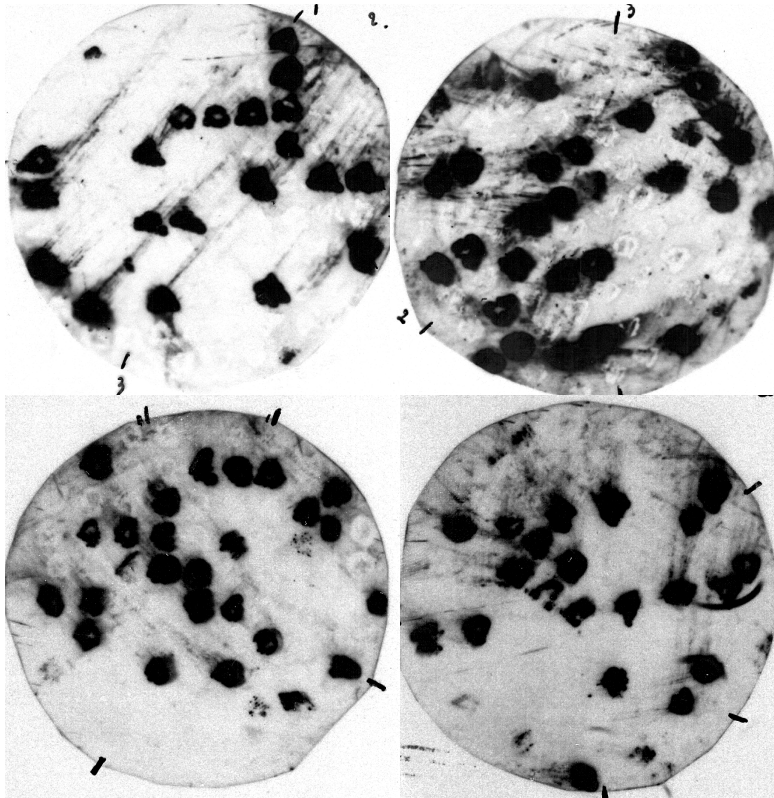
Lorsque l'hybridation se fait à une température de 55°C, la concentration en SSC est diminuée jusqu'à 1x et les lavages se font à 65°C; le pourcentage de clones contenant une séquence microsatellite après le criblage est faible (4%).

Par contre lorsque la température et le temps d'hybridation ont été augmentés et la concentration en sel a été diminuée (jusqu'à SSC 0,2%) pour atteindre une stringence d'hybridation plus élevée, aucun clone positif n'a été détecté. Il semblerait donc que les conditions d'hybridation et/ou de lavage aient été trop stringentes pour permettre aux fragments de s'attacher à la sonde et d'y rester pendant les lavages.

Lorsque la température d'hybridation était de 55°C, la concentration en SSC n'est pas descendue en dessous de 1X et la température des lavages a été de 62°C, le pourcentage de clones positifs lors du criblage a augmenté à 49%. Les conditions mises en place ont donc permis d'améliorer l'enrichissement de la collection de fragments d'ADN en séquences microsatellites.

La mise au point du protocole relatif à l'hybridation sur membrane et au marquage chimiluminescent (marquage au froid) a été faite. En effet, au

final, sur les 200 clones criblés sur membrane, 98 ont été visualisés sur film auto radiographique (**figure 70**).



**Figure 70** : 200 clones criblés et 98 clones positifs par hybridation de sonde  $GA_{15}$  biotinylée chez le *pigeonpea*.

La mise au point des conditions de cultures bactériennes et de purification de plasmides a été faite. Sur les 98 clones positifs lors du criblage, 36 ont été sélectionnés sur base de la taille de leur insert.

En effet, après une *miniprep*, chaque plasmide a subi une restriction par *ECORI* permettant de libérer l'insert (**figure 71**). La taille de celui-ci a pu être estimée lors de la migration sur gel d'agarose. Nous avons donc sélectionné les inserts ayant la plus grande taille (>400 pb) (**figure 72**).

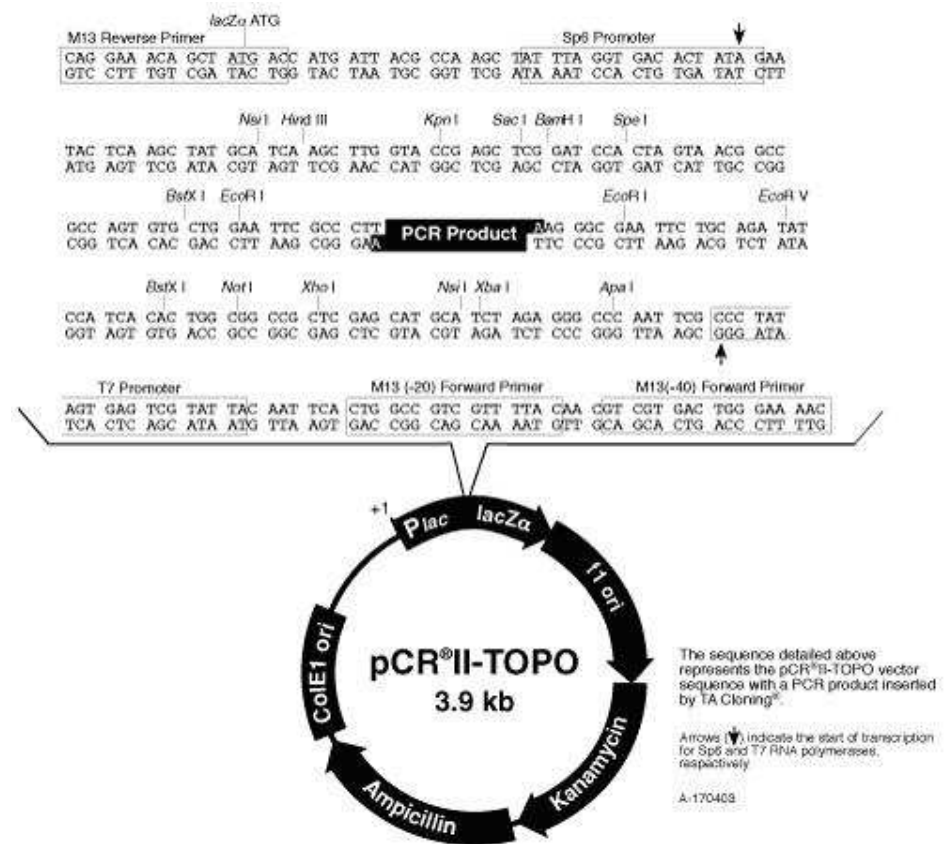
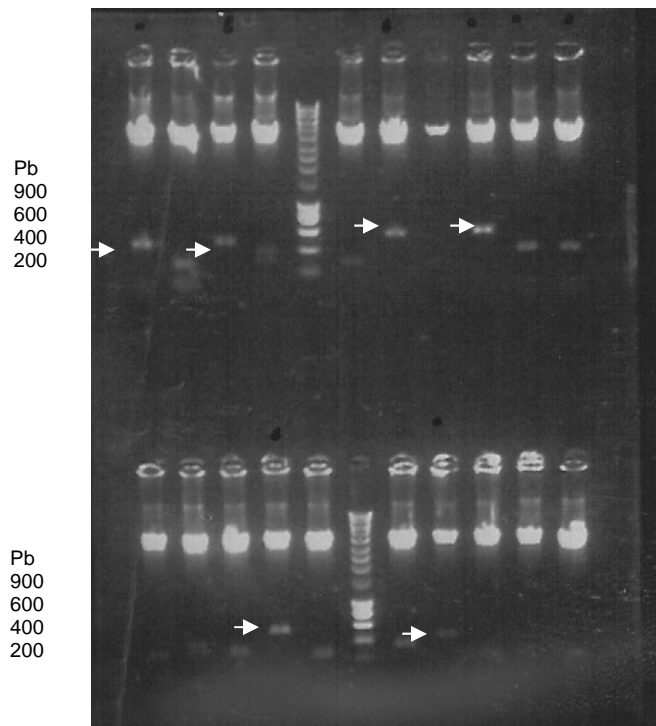


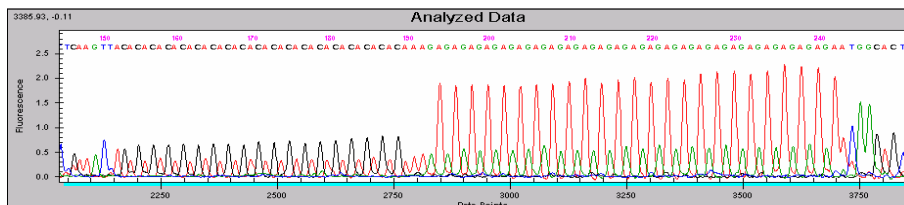
Figure 71 : Séquence de l'insert PCRII.



**Figure 72 :** Sélection de la taille des inserts par migration sur gel d'agarose (>400pb).

En conséquence, 36 clones ont été sélectionnés et séquencés (**tableau 36**) en utilisant un séquenceur capillaire Beckman (**figure 73**), en d'autres termes, 36,7% (36/98) des clones positifs lors du criblage ont été séquencés, 75% (27/36) de clones contenaient un microsatellite et 9/36 clones ne comportaient pas de microsatellite: il s'agissait de faux positifs (25%).

Parmi les 27 clones que contenait un microsatellite, seulement 48,2% (13/27) étaient utilisables. 44,4% (12/27) de clones étaient redondants, 7,4% (2/27) de clones contenaient des séquences Fw et Rv qui ne s'assemblaient pas, probablement à cause d'un problème de séquençage.



**Figure 73 :** Sortie microsatellite de séquenceur capillaire.



**Tableau 36:** Caractéristiques observées des clones séquencés.

N°	Clones	Fw	Rv	CAn	GAn	Caractéristique	Clones sélectionnés
1	CCGA 1	x	x			pas de microsat	
2	CCGA 2	x	x			pas de microsat	
3	CCGA 3	x	x		12	redondant égal au clone 54	
4	CCGA 4	x	x			pas de microsat	
5	CCGA 9	x	x		21	redondant égal au clone 88	
6	CCGA 11	x	x	18	26	redondant égal au clone 59	
7	CCGA 12	x	x		38	utilisable	sélectionné
8	CCGA 18	x	-	9	17	utilisable	bord trop court
9	CCGA 22	-	x			pas de microsat	
10	CCGA 23	x	x	18	26	redondant égal au clone 59	
11	CCGA 25	x	x	18	26	redondant égal au clone 59	
12	CCGA 26	-	x			pas de microsat	
13	CCGA 29	x	x		17	utilisable	sélectionné
14	CCGA 32	x	x	18	26	redondant égal au clone 59	
15	CCGA 37	x	-	18	26	redondant égal au clone 59	
16	CCGA 44	x	x		40	utilisable	sélectionné
17	CCGA 48	-	x			pas de microsat	
18	CCGA 49	x	x	18	26	redondant égal au clone 59	
19	CCGA 52	x	-			pas de microsat	
20	CCGA 53	x	x		27	utilisable	bord trop court
21	CCGA 54	x	x		12	utilisable	sélectionné
22	CCGA 59	-	x	18	26	utilisable.	non sélectionné
23	CCGA 61	x	-			pas de microsat	
24	CCGA 65	x	-			pas de microsat	
25	CCGA 67	x	x		21	redondant égal au clone 88	
26	CCGA 70	x	x		36	pas d'assemblage	
27	CCGA 72	x	x		26	pas d'assemblage	
28	CCGA 73	x	-	18	26	redondant égal au clone 59	
29	CCGA 74	x		14	26	utilisable	non sélectionné
30	CCGA 78	x	x		6	utilisable	répétitions courtes
31	CCGA 81	x	x		(5)(6)(6)(7)	utilisable	sélectionné
32	CCGA 87	x	x		60	utilisable	sélectionné
33	CCGA 88	x	x		21	utilisable	sélectionné
34	CCGA 93	x	-		3	utilisable	répétitions courtes
35	CCGA 94	x	-		12	redondant égal au 54	
36	CCGA 99	x	x	18	26	redondant égal au 59	

## 1.2 Définition des amorces

A partir des 13 clones contenant des séquences utilisables, un total de 7 paires d'amorces a été conçu après rejet de 6 clones (2 clones contenaient des séquences microsatellites avec des répétitions très courtes qui ont été éliminées. 2 clones contenaient des séquences avec des bords trop courts pour définir des amorces).

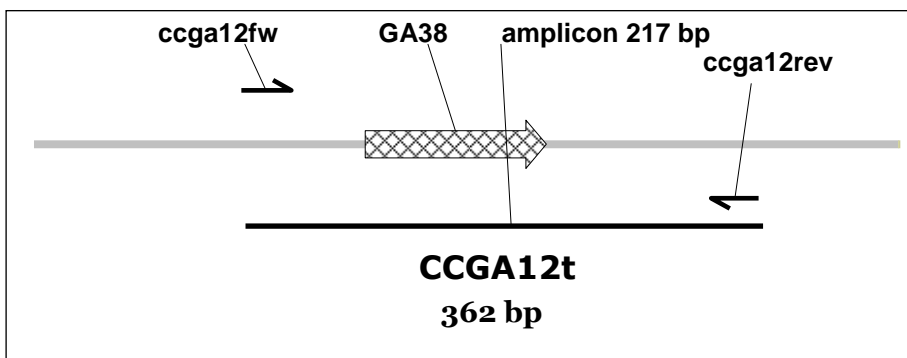
Concernant les principaux facteurs qui empêchent la définition des amorces dans tous les inserts séquencés, on retrouve en premier lieu la redondance. On considère qu'il existe de la redondance si les inserts contiennent plus de 95% de similitude dans les séquences bordant des microsatellites. Dans notre cas 12/36 soit 33% de redondance ont été observé.

Un autre facteur qui a empêché la définition des amorces a été des motifs microsatellites trop courts, lesquelles ne peuvent probablement pas produire de polymorphisme. Dans notre étude 2 séquences de trois et six répétitions ont été détectées (GA<sub>3</sub> et GA<sub>6</sub>).

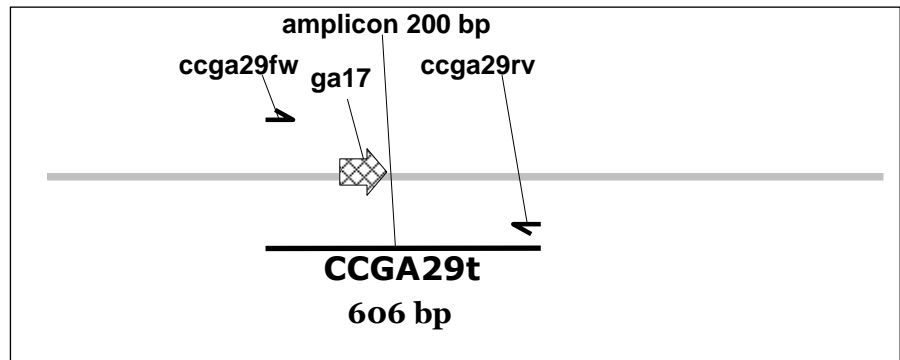
Un troisième facteur négatif a été défini par la présence des séquences bordantes interrompues où il n'était pas possible de définir une amorce. Dans notre cas 4/13 soit 30% des séquences utilisables contenaient des séquences bordantes interrompues.

Dans le choix des séquences contenant des microsatellites, celles présentant un grand nombre de répétitions ont été favorisés.

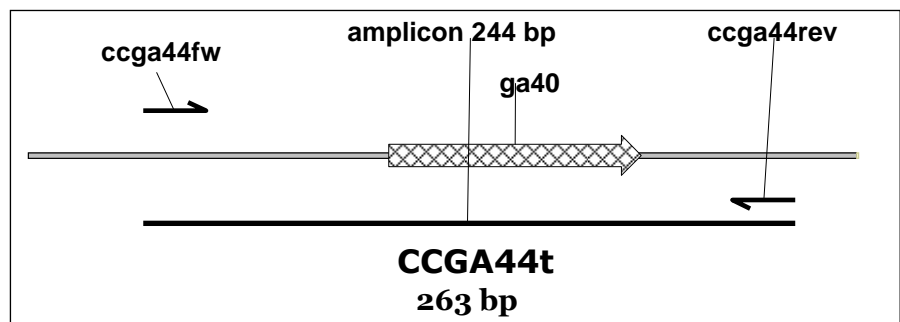
Les **figures** du **74** à la **80** représentent schématiquement les microsatellites avec la position des amorces forward et reverse, la position du microsatellite et la taille de l'amplicon. Les paires d'amorces forward et reverse sont montrées au **tableau 37**.



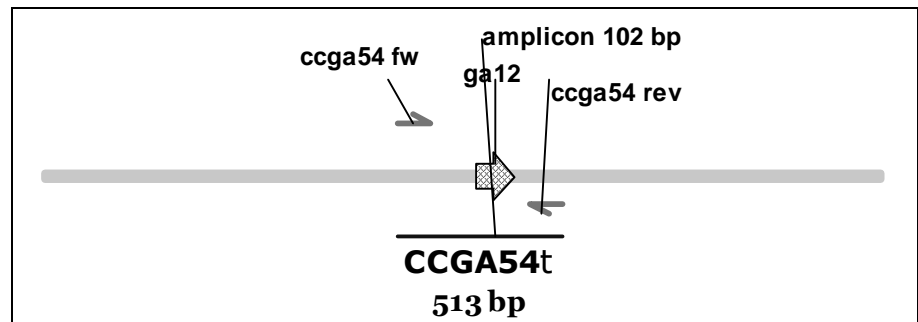
**Figure 74** : Représentation schématique du microsatellite CCGA 12.



**Figure 75 :** Représentation schématique du microsatellite CCGA 29.



**Figure 76 :** Représentation schématique du microsatellite CCGA 44.



**Figure 77:** Représentation schématique du microsatellite CCGA 54.

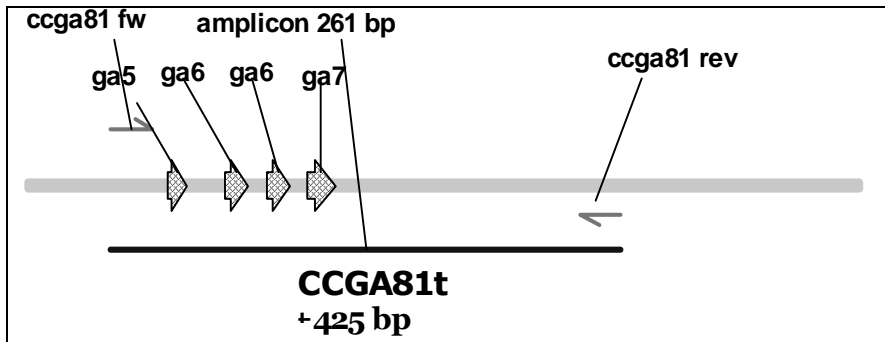


Figure 78 : Représentation schématique du microsatellite CCGA 81.

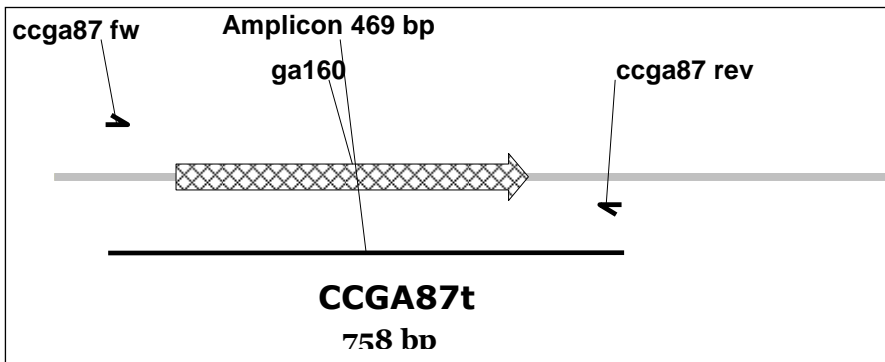


Figure 79 : Représentation schématique du microsatellite CCGA 87.

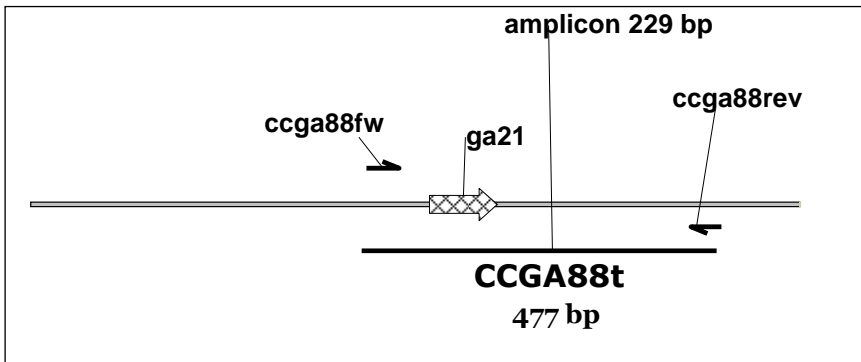


Figure 80 : Représentation schématique du microsatellite CCGA 88.

**Tableau 37** : Amorces Fw et Rv déterminées.

N°	Amorce	Séquences
1	ccga12	F : 5'-CCA-TAT-GCT-CAC-CCC-TAA-TTG-3' R : 5'-GTT-TCT-TGA-CGG-AAT-TGG-ATG-GTA-TGC-3'
2	ccga29	F: 5'-ATA-CGG-ACA-CGC-ACA-CAC-AT-3' R : 5'-GTT-TCT-TCC-CCT-ATC-TTC-AAA-GGC-AGA-3'
3	ccga44	F: 5'-ATC-TCC-GCC-TCA-CAC-TTG-AT-3' R : 5'-GTT-TCT-TGC-GAT-TCG-TCG-TCT-TCC-ATA-3'
4	ccga54	F : 5'-GGG-TTC-AGC-CAA-GAG-ATT-GA-3' R: 5'-GTT-TCT-TCC-ACT-TTC-ACA-CCA-CCA-C-3'
5	ccga81	F: 5'-AAA-ATA-TAC-TGA-GGG-AAG-TGA-A-3' R : 5'-GTT-TCT-TGA-AAC-TTG-GGC-AGA-ACC-TT-3'
6	ccga87	F : 5'-TAG-CAC-CAT-TAT-CCC-CAT-CG-3' R : 5'-GTT-TCT-TCC-AAG-ATG-AGG-AGG-AAG-GTG-3'
7	ccga88	F : 5'-CTG-GGG-ATT-CTG-CGT-TTC-TA-3' R : 5'-GTT-TCT-TGG-GTG-GTC-AAG-AAT-TCA-CA-3'

### 1.3 Optimisation des conditions d'amplification

Une fois les amorces définies et sélectionnées, les conditions d'amplification ont été mises au point. Pour cela, un gradient de température d'hybridation a été utilisé. Pour chaque amorce, nous avons réalisé une amplification avec des températures d'hybridation différentes allant de 55 à 65°C.

Six des sept amorces ont amplifiées à 58,7°C ainsi qu'à 57°C mais afin d'éviter les amplifications non spécifiques, nous avons préféré choisir la température d'hybridation la plus élevée.

Des conditions optimales ont été établies pour 7 loci microsatellites (**tableau 38**) ayant pour résultat l'amplification de 100% des amorces qui ont été conçues.

Les conditions d'amplification des amorces ont été optimisées lorsqu'une faible amplification a été produite. Le programme PCR gradient de 65-55°C (le  $T_a$  = 58,7°C) était idéal pour la totalité des amorces (100%) tandis que le programme 65-55°C ( $T_a$  = 61,2°C) a été optimal pour 85% des amorces.

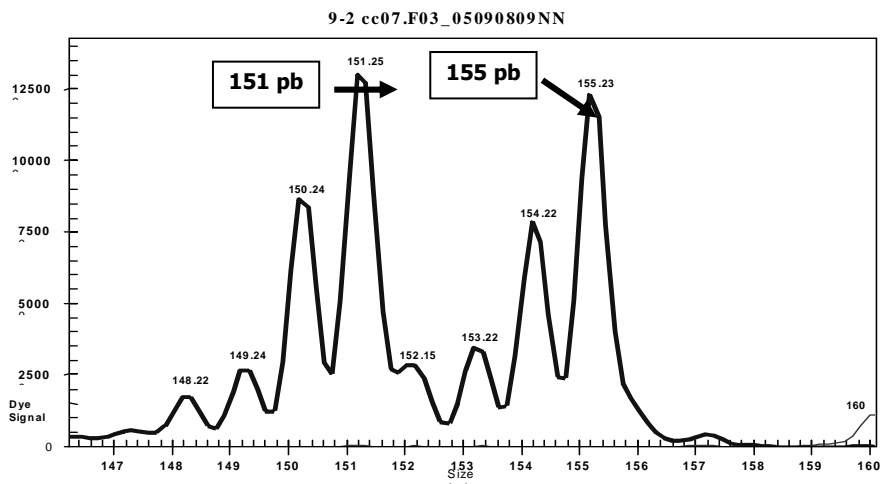
**Tableau 38** : Optimisation des températures d'amplification.

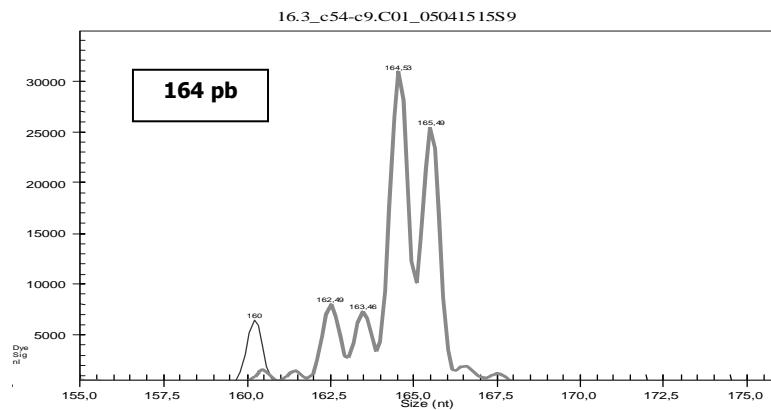
T°C/Am	CCGA12 (217 pb)	CCGA29 (200 pb)	CCGA44 (244 pb)	CCGA54 (102 pb)	CCGA81 (261 pb)	CCGA87 (469 pb)	CCGA88 (229 pb)
65,0 °C	Non	amplifie	amplifie	amplifie	Non	amplifie	Non
64,3 °C	Non	amplifie	amplifie	amplifie	Non	amplifie	Non
63,8 °C	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	Non	amplifie	amplifie
61,2 °C	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	Non	amplifie	amplifie
58,7 °C	<b>amplifie</b>	<b>amplifie</b>	<b>amplifie</b>	<b>amplifie</b>	<b>amplifie</b>	<b>amplifie</b>	<b>amplifie</b>
57,0 °C	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie
55,8 °C	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie
55,0 °C	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie	amplifie

## 1.4 Détermination de la taille des allèles microsatellites

Dans une sortie de séquenceur capillaire, nous avons plusieurs pics pour un allèle qui correspondent à des amplifications incomplètes des motifs de type microsatellite. Cela s'explique par le fait que pendant l'amplification, la polymérase saute une ou plusieurs répétitions donnant ainsi des fragments plus petits. Le pic pris en compte pour déterminer la taille de l'allèle est celui précédant la chute d'intensité.

En abscisse nous avons la taille des fragments obtenue grâce à la migration simultanée d'un standard de taille. En ordonnée, nous avons l'intensité du signal fluorescent. La **figure 81** représente un individu hétérozygote. En effet, on observe clairement les deux pics correspondant aux deux allèles de tailles différentes. La **figure 82** représente un individu homozygote, un seul pic correspond à un seul allèle.

**Figure 81** : Séparation des fragments sur séquenceur capillaire d'un individu hétérozygote.



**Figure 82 :** Séparation des fragments sur séquenceur capillaire d'un individu homozygote.

### 1.5 Efficience de l'isolement de marqueurs microsatellites chez le *pigeonpea*

Le développement de la banque enrichi de *pigeonpea* a permis le criblage de 200 clones, 98 d'eux ont été détectés positifs lors du criblage.

En considérant la taille de l'insert, seulement 36 clones ont été séquencés dans les deux directions, donnant 64 séquences. Seules 27 séquences contenaient un microsatellite.

7 paires d'amorces ont été définies. Un résumé du total des séquences produites est présenté au **tableau 39**.

**Tableau 39 :** Efficience de l'isolement de marqueurs microsatellites chez le *pigeonpea*.

Nombre de clones criblés	Nombre de clones positifs lors du criblage	Nombre de clones séquencés dans le deux sens (2x)	Nombre de clones contenant des microsatellites	Nombre de paires d'amorces définies
200	98	36	27	7
100 %	49 %	18,5 %	13,5 %	3,5 %

Le motif le plus long a été un GA avec 160 répétitions ininterrompues. Les répétitions étaient parfaites dans la plupart des cas sauf une répétition interrompue le CCGA 81 avec les répétitions (GA)<sub>5</sub> (GA)<sub>6</sub> (GA)<sub>6</sub> (GA)<sub>7</sub>.

Dans cette étude, 7 nouveaux microsatellites de *pigeonpea* ont été développés. Leur polymorphisme et leur utilisation pour la caractérisation de la diversité seront discutés en détail dans le sous-chapitre suivant.

Beaucoup d'études traditionnelles d'isolement de microsatellite ont indiqué une moyenne de seulement 2,3% de clones positifs finaux (Zane *et al.*, 2002) après séquençage. Le pourcentage moyen de faux positifs dans de telles études a été estimé à 48,7% (Squirrel *et al.*, 2003). Cette étude indique 13,5% de clones contenant un microsatellite mais sans tenir compte de 51% de faux positifs. Odeny (2007) arrive aussi à des résultats similaires (6,4% de clones contenant un microsatellite mais sans tenir compte de 77% de faux positifs).

La courte longueur des oligonucléotides utilisés en tant que sondes est une raison possible de la proportion élevée de faux positifs qui en résulte. La longueur de la sonde appliquée par l'hybridation peut influencer le type et la longueur des microsatellites capturés. Armour *et al.*, (1994) ont constaté que de plus longues sondes d'oligonucléotides favorisent l'isolement des répétitions relativement longues.

Nous avons utilisé un oligonucléotide de 15pb là où d'autres (Stajner *et al.*, 2005) ont employé des sondes beaucoup plus longues (200-550pb).

Les rapports d'enrichissement dans la littérature varient de 20 à 95%, en fonction principalement du procédé et de la méthode employé (Stajner *et al.*, 2005). En effet, la banque enrichie préparée dans cette étude a permis l'isolement des microsatellites (13,5%), mais des problèmes de redondance ont réduit ce pourcentage à la moitié. De tels problèmes de redondance ont déjà été signalés (Rallo *et al.*, 2000 ; Mba *et al.*, 2001) y compris sur *pigeonpea* (Burns *et al.*, 2001).

La redondance globale dans cette banque était de 12/27=44%, un peu plus que la redondance moyenne (37%) évaluée pour Squirrel *et al.*, (2003) (71 espèces de plantes étudiées), mais comparable à ce qui a été rapporté chez d'autres légumineuses comprenant le haricot (70%) (Gaitán-Solis *et al.*, 2002) et l'arachide (67%) (He *et al.*, 2003) ou la redondance a été plus élevée.

Le niveau élevé de redondance trouvé dans cette banque pourrait résulter de l'amplification PCR effectuée après la capture d'affinité et avant le clonage. Cette étape a été effectuée afin d'augmenter la quantité d'ADN. Billotte *et al.*, (1999) ont suggéré la réduction du nombre de cycles d'amplification PCR avant le clonage pour réduire la redondance et les clones chimériques.

## 1.6 Vérification du polymorphisme des microsatellites

Une fois les mises au point des conditions d'amplification faites, les amorces ont été sélectionnées montrant le plus de polymorphisme. Une dizaine de génotypes (d'origine différente : péruvienne, africaine, indienne) ont été amplifiés avec les 7 paires d'amorces microsatellites. Les produits d'amplification ont été séparés sur un gel d'acrylamide, lequel a permis



d'éliminer les locus microsatellites ne présentant pas de polymorphisme (non informatifs).

Alors que l'amplification de 7 microsatellites isolés chez le *pigeonpea* a été possible, un faible polymorphisme a été détecté parmi l'échantillon des populations d'origine péruvienne, africaine et indienne. Le microsatellite le plus polymorphe a été un (GA)<sub>12</sub> et a montré 4 allèles autour de 100 à 107pb (**tableau 40**).

**Tableau 40** : Sept locus microsatellites isolés chez le *pigeonpea*.

Locus	Répétition	T°C	Taille attendu pb	N allèles	Taille min pb	Taille max pb
CCGA12	(GA)38	58,7	217	2	215	221
CCGA29	(GA)17	58,7	200	2	198	200
CCGA44	(GA)40	58,7	244	2	240	244
CCGA54	(GA)12	58,7	100	4	100	107
CCGA81	(GA)5 (GA)6 (GA)6 (GA)7	58,7	261	2	261	265
CCGA87	(GA)160	58,7	469	2	469	473
CCGA88	(GA)21	58,7	229	2	229	231

### 1.7 Caractéristiques des marqueurs SSR chez le *pigeonpea*

La sonde utilisée dans notre étude a été un GA<sub>15</sub>, laquelle nous a permis d'isoler de microsatellites avec une longueur variable de 12 répétitions (CCGA54) jusqu'à 160 répétitions (CCGA 87). Stajner *et al.*, (2005) ont employé des sondes longues (200-550 pb) et ont obtenu plus de 50% de clones isolés avec une longueur de microsatellites plus grande que 16 unités de répétition et seulement 2% de clones ayant moins de 5 unités de répétition. La faible longueur des oligonucléotides utilisés en tant que sondes est une raison possible de la proportion élevée de faux positifs observés dans les protocoles d'obtention de microsatellites. La longueur de la sonde d'hybridation peut influencer le type et la longueur des microsatellites capturés. Armour *et al.*, (1994) ont constaté que de plus longues sondes d'oligonucléotides favorisent l'isolement de séquences relativement longues.

Les répétitions dinucléotide GA/CT sont les plus abondantes chez d'autres légumineuses (Ferguson *et al.*, 2004; Lichtenzweig *et al.*, 2005). D'ailleurs, dans une autre étude d'ESTs du blé (*Triticum aestivum* L.), du riz (*Oryza sativa* L.), du maïs (*Zea mays*) et du soja, les répétitions GA ont été identifiées comme les répétitions de dinucléotides les plus fréquentes en général (Gao *et al.*, 2003). Ceci suggère que les répétitions GA pourraient être les répétitions de dinucléotides les plus abondantes dans les régions codantes de beaucoup de génomes végétaux.

La plupart des répétitions AT on été trouvées dans des régions non-codantes (Temnykh *et al.*, 2001). Les répétitions GC sont extrêmement rares dans la plupart des génomes (Cui *et al.*, 2005). Bien que les répétitions

dinucléotidiques soient généralement la classe la plus utilisée des marqueurs microsatellites chez les plantes, on observe des difficultés de génotypage dues à une fréquence élevée de slipage (Levinson et Gutman, 1987).

Quant aux allèles nuls, leur occurrence dépend de la composition génétique de l'espèce. Aucun rapport de la littérature ne signale son occurrence chez le *pigeonpea*. Nos tests ont comporté l'amplification des amorces chez 10 individus. Nous avons rejeté ceux qui n'avaient pas amplifié chez tous les individus, donc indirectement nous avons limité la possibilité de leur présence. Des allèles nuls sont observés en présence de polymorphisme dans les séquences complémentaires des amorces (Tang *et al.*, 2002) particulièrement dans des régions non codantes (Mogg *et al.*, 2002).

## 1.8 Discussion

La recherche de marqueurs s'est avérée très difficile, la construction et l'analyse de la banque génomique n'ont permis que l'identification de sept loci polymorphes. Le coût et le temps requis pour le développement des marqueurs microsatellites a été une contrainte importante. Malgré l'utilisation d'une banque enrichie et le criblage d'une sonde froide pour augmenter les chances de succès, nous avons obtenu dans notre étude, une faible efficacité d'isolation de 3,5%, c'est à dire 7 microsatellites isolés de 200 clones criblés.

Chez le *pigeonpea*, Burns *et al* (2001) ont développé 20 amorces microsatellites, dont seulement 10 se sont montrées polymorphes dans le germoplasme cultivé du *pigeonpea*. Dans cette étude, des sondes (CA)<sub>15</sub> et (CT)<sub>15</sub> ont été employées. Le criblage de microsatellites polymorphes a été conduit sur un ensemble de 12 accessions de *pigeonpea*.

Postérieurement au démarrage de notre étude, Odeny, 2007 a publié 20 amorces microsatellites, dont 19 paires ont produit des amplifications polymorphes parmi 15 accessions du germoplasme sauvage et cultivé.

Chez d'autres légumineuses comme, chez *Glycine max* (soja) plus de 1000 loci microsatellites ont été étudiés (Song *et al.*, 2004), chez *Cicer arietinum* L. (pois chiche), environ 400 loci microsatellites (Lichtenzweig *et al.*, 2005), chez *Phaseolus vulgaris* L. (l'haricot commun), plus de 100 (Blair *et al.*, 2003) et aussi chez *Arachis hypogaea* L. (arachide) (Ferguson *et al.*, 2004).

Les microsatellites ont été utilisés dans l'identification du génotype et de la diversité génétique. Les études morphologiques seules ne fournissent pas d'informations suffisantes pour comprendre la diversité génétique des espèces ni leur ressemblance avec d'autres espèces. L'analyse moléculaire par microsatellites devra fournir des informations supplémentaires sur la diversité génétique, ce que nous verrons dans le chapitre suivant.

Les microsatellites obtenus pourront être utilisés pour la certification de semence, le droit d'obtention des variétés ainsi que pour la description et la protection du germoplasme de *pigeonpea*.

## 1.9 Conclusions

Au terme de cette étape nous avons obtenu une faible efficience d'isolement des microsatellites chez le *pigeonpea* (3,5%), à partir de 200 clones cribles.

Alors que l'amplification de 7 microsatellites isolés chez le *pigeonpea* a été possible, leur polymorphisme a été détecté, (parmi un échantillon d'accessions d'origine péruvienne, africaine et indienne) le microsatellite le plus polymorphe a été CCGA54 un (GA)<sub>12</sub> qui a montré 4 allèles autour de 100 à 107pb.

Dans cette étude, 7 nouveaux microsatellites ont été développés chez le *pigeonpea*. Leur polymorphisme et leur utilisation pour la caractérisation de la diversité seront discutés en détail dans le sous-chapitre suivant.

## **2. Caractérisation de la collection de *pigeonpea* sur base de microsatellites**

Dans cette partie, nous présenterons les résultats de la caractérisation moléculaire de la collection du *pigeonpea* sur base des marqueurs microsatellites.

### **2.1 Extraction d'ADN -*phytoPASS***

L'extraction de l'ADN est une étape limitant (Lange *et al.*, 1998) : de nombreux protocoles prennent trop de temps pour l'extraction ou encore ne sont pas adaptés aux études de caractérisation génétique des populations qui nécessitent la manipulation de nombreux échantillons (Briard *et al.*, 2000). Les méthodes d'extraction d'ADN dans le cadre des études des populations végétales doivent être rapides, peu coûteuses et aussi donner de bons rendements en ADN (Chen, 1999).

La méthode *phytoPASS* pour l'extraction de l'ADN nous a permis de manipuler et de transporter un grand nombre d'échantillons, d'extraire facilement leur ADN génomique de qualité.

### **2.2 Amplification PCR**

Seulement un des microsatellites isolé (CC54) parmi les sept développés au chapitre précédent, s'est révélé polymorphe. Le microsatellite polymorphe est un GA<sub>(12)</sub> et a montré 4 allèles autour de 100 à 106pb.

Neuf paires d'amorces microsatellites de Burns *et al.* (2001) ont été testées: CCB10, CCB9, CCB8, CCB7, CCB6, CCB5, CCB4, CCB2 et CCB1. Cinq d'entre elles se sont montrées polymorphes: CCB9, CCB8, CCB7, CCB4, CCB2 et 4 non polymorphes : CCB1, CCB5, CCB6 et CCB10.

25 paires d'amorces fournies par l'ICRISAT ont aussi été testées, dans lesquelles seulement 3 amorces : pgm3, pgm6 et pgm64 ont amplifiées une séquence. Finalement seulement la paire : pgm3 s'est montrée polymorphe avec les accessions de notre étude.

Seulement 19 amorces ont été retenues et évaluées pour leur polymorphisme dans des tests préliminaires (**tableau 41**). Finalement, seulement 7 loci microsatellites se sont montrés polymorphes au total (**tableau 42**). 51 accessions ont été testées avec chacun des 7 microsatellites.

**Tableau 41:** Microsatellites qui amplifient avec un échantillon de 10 ADN d'origines diverses chez le *pigeonpea*.

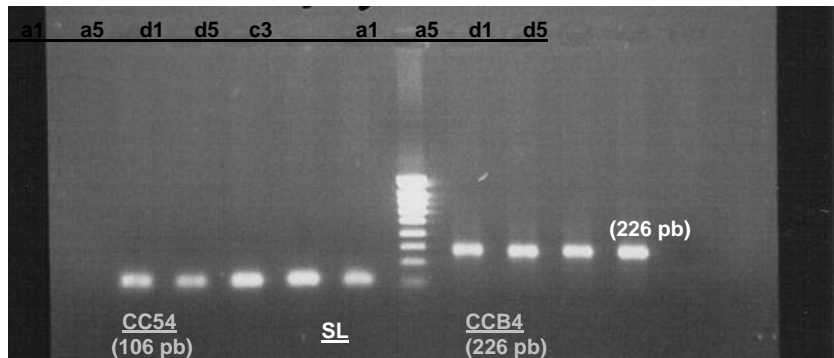
N	Locus	Rep	T°	Taille attendue (pb)	Source	Raison d'élimination
1	ccga12	(GA) <sub>38</sub>	58	217	URBV	Faible polymorphisme
2	ccga29	(GA) <sub>17</sub>	58	200	URBV	Faible polymorphisme
3	ccga44	(GA) <sub>40</sub>	58	244	URBV	Faible polymorphisme
4	ccga54	(GA) <sub>12</sub>	58	102	URBV	<b>sélectionné</b>
5	ccga81	(GA) <sub>5</sub> (GA) <sub>6</sub> (GA) <sub>6</sub> (GA) <sub>7</sub>	58	261	URBV	Faible polymorphisme
6	ccga87	(GA) <sub>160</sub>	58	469	URBV	Faible polymorphisme
7	ccga88	(GA) <sub>21</sub>	58	229	URBV	Faible polymorphisme
8	CCB10	(CA) <sub>15</sub>	50	244	Burns <i>et al.</i>	Faible polymorphisme
9	CCB9	(CT) <sub>22</sub>	55	178	Burns <i>et al.</i>	<b>sélectionné</b>
10	CCB8	(CT) <sub>30</sub>	52	139	Burns <i>et al.</i>	<b>sélectionné</b>
11	CCB7	(CT) <sub>16</sub>	57	155	Burns <i>et al.</i>	<b>sélectionné</b>
12	CCB6	(CA) <sub>6</sub>	57	205	Burns <i>et al.</i>	Faible polymorphisme
13	CCB5	(CT) <sub>22</sub>	57	201	Burns <i>et al.</i>	Faible polymorphisme
14	CCB4	(CT) <sub>31</sub>	57	226	Burns <i>et al.</i>	<b>sélectionné</b>
15	CCB2	(CT) <sub>21</sub>	55	163	Burns <i>et al.</i>	<b>sélectionné</b>
16	CCB1	(CA) <sub>10</sub>	57	198	Burns <i>et al.</i>	Faible polymorphisme
17	Pgm3	Inconnue ICRISAT	60-55	180	ICRISAT	<b>sélectionné</b>
18	Pgm6	Inconnue ICRISAT	60-55	190	ICRISAT	Faible polymorphisme
19	Pgm64	Inconnue ICRISAT	60-55	200	ICRISAT	Faible polymorphisme

**Tableau 42:** Caractéristiques des loci microsatellites polymorphes testés chez le *pigeonpea*.

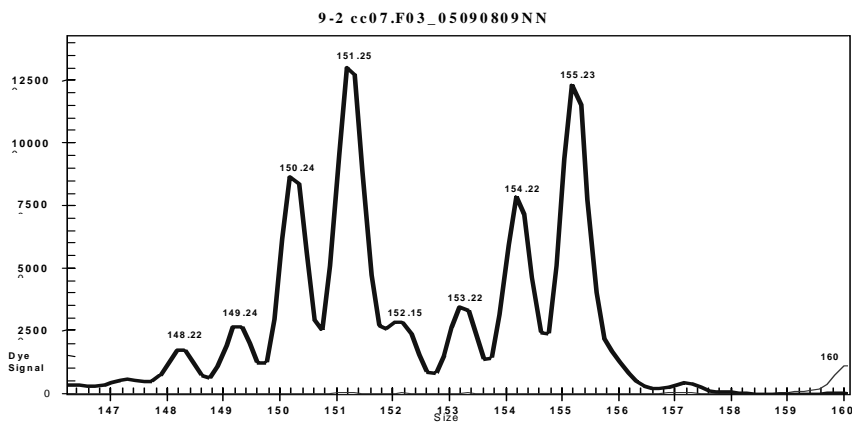
N	Locus	Rep	T°C	Taille attendue bp	Taille obs. (pb)	N allèles
1	ccga 54	GA <sub>12</sub>	57	102	100-106	4
2	CCB9	(CT) <sub>22</sub>	55	178	151-181	9
3	CCB8	(CT) <sub>30</sub>	52	139	116-143	10
4	CCB7	(CT) <sub>16</sub>	57	155	149-154	8
5	CCB4	(CT) <sub>31</sub> imparfait	57	226	242-254	3
6	CCB2	(CT) <sub>21</sub>	55	163	158-168	3
7	Pgm3	inconnue	57	200	195-205	6

## 2.3 Analyse des fragments

Même si l'amplification des sept microsatellites a été possible et observable par migration sur gel d'agarose (**figure 83-A**), l'analyse des fragments par séquenceur capillaire a été indispensable (**figure 83-B**) pour évaluer les différents allèles.



**Figure 83-A** : Séparation des fragments sur gel d'agarose (1%) des amorces CC54 et CCB4 chez le *pigeonpea*. ADN: a1 et a5 (peruviennes), d1 et d5 (africaines), c3 (indienne).



**Figure 83-B** : Séparation des fragments par séquenceur capillaire.

## 2.4 Conclusions

Un nombre total de 49 microsatellites a été testé, parmi ceux-ci, seulement 19 ont été retenus pour le test de polymorphisme, seulement 7 se sont montrés polymorphes. La caractérisation de la collection a été possible avec 7 microsatellites provenant de 3 sources : 1 isolé dans notre laboratoire : (CC54), 5 de la littérature (Burns *et al.* 2001) : CCB9, CCB8, CCB7, CCB4, CCB2 et 1 fourni par l'ICRISAT : pgm3.

### 3. Analyse de la diversité et de la structure génétique d'une collection de *pigeonpea*

Afin de réaliser l'analyse de la diversité et de la structure génétique de la collection de *pigeonpea* quatre aspects seront traités : l'analyse de la diversité des marqueurs, l'analyse de la diversité génétique intra-population, l'analyse de la diversité génétique inter-population et finalement l'analyse de la structure génétique des populations.

#### 3.1 Analyse de la diversité des marqueurs

Tout d'abord le nombre et la taille d'allèles ont été calculés. 42 allèles ont été identifiés par leur taille (pb) après analyse des 7 loci avec 247 individus appartenant à 51 accessions de 6 groupes d'origines différentes : péruvien, africain, indien, équatorien, de la forêt péruvienne et de variétés améliorées. Le nombre d'allèles obtenus pour chaque locus analysé varie de 3 allèles pour le marqueur cc07 à 13 allèles pour le marqueur cc08 (**tableau 43**).

La variation allélique observée aux loci microsatellites varie considérablement entre les groupes. Le nombre moyen d'allèles par locus chez les individus de *pigeonpea* étudiés a été de 6. Une analyse précédente de diversité des espèces cultivées de *pigeonpea* a rapporté une moyenne de 3.10 pour 10 loci polymorphes (Burns *et al.*, 2001). La variation allélique est semblable dans d'autres cultures légumineuses telles que le haricot commun (6 allèles par locus) et l'arachide (moyenne de 4.25 allèles par locus, Gaitán-Solis *et al.*, 2002).

**Tableau 43** : Taille des allèles observés (pb) de 7 loci microsatellites chez 51 accessions de *pigeonpea*.

Loci	Allèles													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Tot
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
cc54	101	103	105	107										4
cc09	151	153	163	165	169	177	181							7
cc08	115	117	121	123	125	127	129	131	135	137	139	141	143	13
cc07	148	152	154											3
ccb4	242	244	246	248	252	254								6
cc02	158	164	166	168										4
pgm3	196	198	200	202	206									5
TOTAL allèles														42

La diversité génétique d'un locus donné est exprimée également par le **PIC** (Polymorphic Information Content) lui-même calculé, par la formule décrite par Saal et Wricke (1999). La valeur **PIC** donne une estimation du pouvoir discriminant d'un locus en prenant compte du nombre d'allèles et aussi de la fréquence de chacun. Les valeurs de **PIC** vont de 0 (monomorphe) à 1 (hautement discriminant, avec plusieurs allèles de fréquence semblable). Les valeurs **PIC** sont repris dans le **tableau 44**.

**Tableau 44** : Valeur de PIC pour chaque locus chez les accessions de *pigeonpea*.

N	Locus	Taille obs. (pb)	N allèles	$H_e$	PIC
1	CC54	100-107	4	0.405	0,332
2	CCB9	151-181	7	0.206	0,204
3	CCB8	116-143	13	0.393	0,391
4	CCB7	149-154	3	0.538	0,431
5	CCB4	242-254	6	0.656	0,605
6	CCB2	158-168	4	0.116	0,113
7	Pgm3	195-205	5	0.548	0,540
Valeur moyenne			6	0,409	0,374

La valeur maximale a été notée pour le locus CCB4 (0,605) et la valeur plus faible pour le locus CCB2 (0.113).

Si nous comparons le locus CCB8 (**PIC**=0,391, 13 allèles) et le locus CCB4 (**PIC**= 0,605, 6 allèles), c'est le locus CCB8 qui révèle un nombre plus élevé d'allèles, mais l'un d'entre eux est trouvé à des fréquences très hautes (1), il a moins de capacité discriminante que le locus CCB4 qui a 6 allèles mais dans lequel les allèles sont de fréquences similaires.

Chez l'arachide (*Arachis hypogaea*), un niveau de polymorphisme plus bas a été signalé par Cuc *et al.* (2008) avec 46 marqueurs et 112 allèles. De 2 à 5 allèles par locus avec une moyenne de 2,44 par locus. Par contre, les valeurs du **PIC** ont été légèrement plus élevées, elles vont de 0,12 à 0,75 avec une valeur **PIC** moyenne de 0,46.



### 3.2 Diversité génétique intra-population

Les paramètres de diversité intra-populations ont été calculés, ils sont montrés dans le **tableau 45**.

**Tableau 45:** Paramètres de diversité intra-population chez 7 groupes des accessions de *pigeonpea*.

Origine	# acce-ssions	# indv	P	N <sub>a</sub>	N <sub>e</sub>	I	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>
Péruvien	22	110	86	2,4	1,6	0,512	0,216	0,327	0,0223
ISO10	1	5	43	1,6	1,3	0,254	0,086	0,151	0,4483 (*)
Prompex 2000	1	5	43	1,6	1,3	0,275	0,200	0,177	- 0,0959
Indien	5	22	100	3,0	2,1	0,809	0,305	0,475	- 0,1157
Africain	18	85	100	4,6	1,7	0,700	0,192	0,373	0,3310 (*)
Équatorien	3	15	100	2,4	1,5	0,515	0,305	0,299	- 0,0756
Forêt du Pérou	1	5	43	1,4	1,2	0,214	0,143	0,140	0,0909
Moyenne			73	2,4	1,5	0,464	0,216	0,280	

**P** = % des Loci polymorphes

**N<sub>a</sub>** = Nombre observé d'allèles

**N<sub>e</sub>** = Nombre effectif d'allèles [Kimura and Crow (1964)]

**I** = Indice de diversité de Shannon [Lewontin (1972)]

**H<sub>o</sub>** = Hétérozygotie observée et **H<sub>e</sub>** = Hétérozygotie espérée (Nei 1973)

**F<sub>IS</sub>** = Le coefficient de consanguinité

(\*) = *p* inférieur à 0,05 alors H<sub>o</sub> rejetée et H<sub>1</sub> acceptée. La valeur observée est significativement différente d'une distribution statistiquement aléatoire et donc nous pouvons la prendre en compte

#### 3.2.1 Le pourcentage de loci polymorphes (P)

Les accessions du groupe d'origine indienne, africaine et équatorienne ont 100% de loci polymorphes, suivies des accessions péruviennes avec 86%. Les groupes des variétés améliorées et de la forêt ont un polymorphisme moins élevé (43%).

L'utilité de ce paramètre dépend du nombre de loci analysés. **P** n'est pas informatif lorsque peu de locus sont analysés (Berg and Hamrick 1997). Aussi **P** varie en fonction de la taille de l'échantillon analysé, les allèles de faibles fréquences peuvent être facilement observés dans des échantillons de grande taille. Ce paramètre n'est donc pas un bon indicateur de la variabilité allélique (Nei, 1987).

### 3.2.2 Le nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ) et le nombre effectif d'allèles ( $N_e$ )

Une autre mesure de la variabilité est la moyenne du nombre d'allèles par locus ( $N_a$ ). De plus, pour déterminer la fréquence de ces allèles, pour un locus et un taux d'hétérozygotie donnés, on définit le nombre d'allèles efficaces ( $N_e$ ), maintenus dans une population d'effectif  $N$ , comme le nombre théorique d'allèles possibles dans une population de même taille et de même hétérozygotie à l'état stationnaire, mais dans laquelle tous ces allèles auraient la même fréquence (Kimura et Crow, 1964). On remarque que le nombre efficace d'allèles est plus faible que le nombre réel (sauf dans le cas où ceux-ci ont des fréquences alléliques égales). Dans ce cas, le nombre efficace d'allèles ( $N_e$ ) est égal au nombre réel d'allèles. Dans une situation de consanguinité, les fréquences vont se déséquilibrer, un allèle étant favorisé par hasard au détriment des autres. Le nombre efficace d'allèles sera alors inférieur au nombre réel.

Dans notre étude, une grande hétérogénéité des indices de diversité intra-population a été mise en évidence. D'abord par la faible valeur du nombre moyen d'allèles par locus ( $N_a=2,4$ ), semblable à celui obtenu chez *Sorghum bicolor* : ( $N_a$ ) = 2,43 (Djè et al., 2000), plus haute que la valeur estimée par Ouedraogo (2003) chez *Phaseolus lunatus*, (espèce autogame avec une allogamie facultative)  $N_a$  = 1,64. La différence du nombre moyen d'allèles par locus ( $N_a$ ) entre ces espèces à système de reproduction semblable s'expliquerait par le type de matériel végétal échantillonné. Dans notre étude et celle chez le *sorghum*, le matériel provient d'origines assez distantes, plusieurs pays de 3 continents (Afrique, Asie et Amérique). Par contre pour l'étude chez *Phaseolus lunatus* l'origine est un seul pays (Costa Rica).

Dans notre étude on peut dire que  $N_a$  est plus élevé que  $N_e$ . Le  $N_a$  des variétés indiennes est inférieur à celui des variétés africaines, mais la  $H_e$  des variétés indiennes est plus important que le  $H_e$  des variétés africaines, ce qui pourrait s'expliquer par l'écart de la panmixie apparente signalée par la valeur du  $F_{IS}$ .

### 3.2.3 L'indice de diversité de Shannon ( $I$ )

L'indice de Shannon est un indice d'abondance basé sur la diversité spécifique, plus il est grand, moins les populations sont homogènes. Il permet de décrire, avec d'autres, la structure d'une population. Tous les groupes de notre étude présentent un indice de diversité de Shannon inférieur à 1, ce qui indique que tous les groupes d'accessions ont une tendance à l'homogénéité.

### 3.2.4 L'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ )

L'indice  $H_o$  représente l'hétérozygotie observée, il est mesuré à partir des analyses génotypiques. En comparant ces deux indices il est possible de déduire l'impact des forces évolutives dans les populations dues à l'autofécondation ou à l'autogamie. Ainsi dans notre étude, on observe que l'accession ISO10 a un taux d'hétérozygotie observé ( $H_o$ ) faible de 0,086 et un  $F_{IS}$  relativement haut 0,4483 ce qui pourrait indiquer une tendance à l'autogamie, donc vers une fixation d'allèles. Cette fixation d'allèles s'explique par le fait qu'il s'agit d'une variété commerciale issue d'une sélection individuelle. Par contre, la variété améliorée Prompex2000 montre une plus haute hétérozygotie observée ( $H_o$ ) que celle attendue (EHW), due probablement à son origine multi-parentale.

On a également pu constater que les accessions péruviennes et les variétés indiennes ont présenté un déficit d'hétérozygotie. Par contre les variétés équatoriennes ont un  $H_o$  semblable à celui attendu.

La plus petite valeur de l'hétérozygotie observée par rapport à celle de l'hétérozygotie attendue que nous avons obtenue dans toutes les accessions analysées est aussi rapportée chez *Phaseolus lunatus* Ouedraogo (2003) et le sorgho (Djè *et al.*, 2000). Les écotypes de *Sorghum bicolor* originaires du Maroc et collectés *in situ* possèdent une hétérozygotie observée ( $H_o$ ) de 0,272 et une hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) de 0,719 (Djè *et al.*, 1999). Les valeurs de ces indices sont plus faibles chez les accessions de *Sorghum bicolor* conservées *ex situ* dans les banques de gènes : ( $H_o$ ) = 0,134 et ( $H_e$ ) = 0,291 (Djè *et al.*, 2000). Par contre, chez les espèces allogames, les fréquences génotypiques sont plus proches de celles de Hardy-Weinberg (Charlesworth *et al.*, 2001).

### 3.2.5 Les fréquences alléliques par locus

Les **fréquences alléliques par locus** sont montrées dans le tableau 46-A.

**Tableau 46-A** : Fréquences alléliques par locus.

Locus /Allèle	cc54	cc09	cc02	cc08	cc07	ccb4	pgm3		
A	0.0061	0,0020	0,0101	0,0061	0,0405	0,0020	0,0142		
B	0.2632	0,0142	0,0364	0,0121	0,4899	0,2653	0,2510		
C	0,7247	0,0344	0,9393	0,0385	0,4696	0,4838	0,0951		
D	0,0061	0,8887	0,0142	0,7713		0,1943	0,6154		
E		0,0020		0,0223		0,0263	0,0243		
F		0,0526		0,0931		0,0283			
G		0,0061		0,0142					
H				0,0020					
I				0,0243					
J				0,0040					
K				0,0061					
L				0,0020					
M				0,0040					

On a pu observer que pour le locus cc54, l'allèle le plus fréquent est celui que correspond à la taille de 105pb. Pour le locus cc09, l'allèle le plus fréquent est celui que correspond à la taille de 165pb. Pour le locus cc02, l'allèle le plus fréquent est l'allèle que correspond à la taille de 166 pb. Pour le locus cc08, l'allèle le plus fréquent correspond à la taille de 123pb. Pour le locus cc07, les plus fréquents sont au nombre de deux (152 et 154pb). Pour le locus ccb4, les allèles les plus fréquents sont au nombre de trois, ils correspondent aux tailles 244, 246, 248 pb. Et finalement pour le locus pgm3 deux allèles sont prédominants, ils correspondent aux tailles 198 et 202 pb.

Les fréquences alléliques par locus et par groupe d'accessions sont présentées dans le tableau **46-B**. On a pu observer que les fréquences alléliques sont différentes entre les groupes d'accessions. On observe que des fréquences alléliques faibles apparaissent dans certaines accessions péruviennes, africaines, indiennes et équatoriennes. Certains allèles sont présents chez un seul groupe, mais à des fréquences faibles ( $<0,3$ ).

**Tableau 46-B** : Fréquences alléliques par groupe d'accessions.

Loci	Allèle	Péruviennes	ISO10	Prompex 2000	Indiennes	Africaines	Équatoriennes	Forêt
cc54	100	-	-	-	-	-	0,10	-
	103	0,23	0,20	0,40	0,23	0,31	0,27	0,40
	105	0,77	0,80	0,60	0,77	0,68	0,63	0,60
	107	-	-	-	-	0,02	-	-
cc09	151	-	-	-	-	0,01	-	-
	154	-	-	-	-	-	0,20	0,10
	163	-	-	-	0,09	0,08	-	-
	165	1,00	1,00	1,00	0,41	0,87	0,80	0,90
	169	-	-	-	-	0,01	-	-
	177	-	-	-	0,50	0,02	-	-
cc02	181	-	-	-	-	0,02	-	-
	158	-	-	-	-	-	0,17	-
	164	0,01	0,10	-	0,14	0,05	0,03	-
	166	0,99	0,90	1,00	0,70	0,95	0,80	1,00
cc08	168	-	-	-	0,16	-	-	-
	116	-	-	-	-	-	0,10	-
	118	-	-	-	-	-	0,20	-
	121	-	-	-	-	0,11	-	-
	123	0,79	1,00	1,00	0,50	0,79	0,70	1,00
	125	-	-	-	0,23	0,01	-	-
	127	0,21	-	-	-	-	-	-
	129	-	-	-	-	0,04	-	-
	131	0,01	-	-	-	-	-	-
	134	-	-	-	0,27	-	-	-
	137	-	-	-	-	0,01	-	-
	139	-	-	-	-	0,02	-	-
	141	-	-	-	-	0,01	-	-
cc07	143	-	-	-	-	0,01	-	-
	149	0,01	-	-	0,02	0,02	0,07	1,00
	152	0,43	-	0,30	0,64	0,52	0,93	-
ccb4	154	0,56	1,00	0,70	0,34	0,45	-	-
	242	-	-	-	-	0,01	-	-
	244	0,37	0,20	-	-	0,24	-	0,80
	246	0,56	0,60	0,10	0,05	0,61	0,03	0,20
	248	0,07	0,20	0,10	0,91	0,05	0,97	-
	252	-	-	0,80	0,05	0,02	-	-
pgm3	254	-	-	-	-	0,08	-	-
	195	-	-	-	0,16	-	-	-
	198	0,40	-	-	0,50	0,05	0,17	-
	200	0,05	-	1,00	0,16	0,12	-	-
	202	0,55	1,00	-	0,18	0,76	0,83	1,00
	205	-	-	-	-	0,07	-	-

Les variétés d'origine africaine présentent 13 allèles uniques (**tableau 47**). Les variétés améliorées Prompex2000 et ISO10 ne présentent aucun allèle unique. Cela pourrait s'expliquer par le partage possible des allèles entre les variétés améliorées et les pools africain et indien. Nous avons également mis en évidence l'apparition d'allèles nouveaux dans le cas des variétés équatoriennes qui ont quatre allèles uniques. Trois allèles pour le groupe indien et deux pour le groupe péruvien. Il faudra prendre ces résultats avec prudence vu la taille de l'échantillon, les accessions africaines sont beaucoup plus représentées que les autres groupes.

**Tableau 47** : Allèles uniques chez les groupes d'accessions de *pigeonpea*.

Accessions	Locus	Allèle	Fréquences
Péruviennes	cc08	127	0,21
	cc08	131	0,01
Indiennes	cc02	168	0,16
	cc08	134	0,27
	pgm3	195	0,16
Africaines	cc54	106	0,02
	cc09	151	0,01
	cc09	169	0,01
	cc09	181	0,02
	cc08	121	0,11
	cc08	129	0,04
	cc08	137	0,01
	cc08	139	0,02
	cc08	141	0,01
	cc08	143	0,01
	ccb4	242	0,01
	ccb4	254	0,08
	pgm3	205	0,07
Equatoriennes	cc54	100	0,10
	cc02	158	0,17
	cc08	116	0,10
	cc08	118	0,20

### 3.3 Diversité génétique inter-population

L'étude de la diversité génétique d'une population à travers ses subdivisions qui représentent les sous-populations (à distribution spatiale continue ou discontinue) peut être faite soit par l'analyse des indices de fixation statistiques de Wright (1951), soit par l'analyse des indices de diversité de Nei (1973). Par la suite, nous décrivons ces paramètres de diversité génétique inter-populations couramment utilisés.

#### 3.3.1 *F-statistiques de Wright*

Les **F-statistiques de Wright** permettent de connaître la structure génétique d'une espèce grâce à l'estimation, d'une part, de la fixation des allèles dans l'ensemble des populations ( $F_{IT}$ ) et à l'intérieur des sous-populations ( $F_{IS}$ ) et d'autre part grâce à l'estimation de la différenciation génétique entre les sous-populations ( $F_{ST}$ ).

Les indices de fixation de Wright  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$  sont couramment utilisés pour la différenciation entre des populations et la consanguinité. Les valeurs positives de l'indice  $F_{IS}$  indiquent un déficit d'hétérozygotie par rapport à une population en équilibre de Hardy-Weinberg, qui peut être dû à un écart de la panmixie, un effet Wahlund et ou des allèles nuls (David, 1996).

Les individus considérés ne proviennent pas d'un pool unique de gamètes fécondés au hasard. Il est alors possible de considérer une réassociation non aléatoire des gamètes (consanguinité) ou bien il existe un mélange de groupes différenciés à l'intérieur de l'échantillon (effet Wahlund). Egalement, la non détection du polymorphisme produit une sous-estimation de l'hétérozygotie observée. Ces les cas des allèles nuls (non visualisés).

Les statistiques de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ) ont été calculées pour chaque groupe d'accessions d'origine différente (**tableaux 48**) à l'aide du logiciel SPAGeDi (Hardy and Vekemans, 2002). Le logiciel nous propose également les **R-statistiques** qui sont l'équivalent des **F statistiques** à la différence qu'elles prennent en compte la taille des allèles. En effet, ce modèle se base sur l'hypothèse où deux allèles de tailles voisines sont plus proches que deux allèles de tailles éloignées. Cela signifie que chaque variété posséderait sa propre gamme de tailles pour un locus donné. Si les accessions ne sont pas suffisamment éloignées, les **R-statistiques** ne donneront pas de résultats significatifs. En plus, à l'aide de ce logiciel les tests de permutations (5000 permutations) ont été réalisés.

Le  $F_{IS}$  rend compte de la consanguinité au sein des variétés. Il représente donc la diminution d'hétérozygotes due a ce facteur. Dans notre étude, le  $F_{IS}$  de l'accession ISO10 (0,4483) montre la plus haute valeur positive, ce qui indique un déficit d'hétérozygotie du à une haute consanguinité au sein de cette variété (**tableau 48**). Cela pourrait s'expliquer par la pratique de contrôle de la pollinisation que l'on utilise dans la production de semence de cette variété commerciale dans le but de conserver sa pureté. Celle-ci consiste à protéger les inflorescences terminales avec des sachets de glycine en empêchant en conséquence la

pollinisation de pollen d'autres plantes. Aussi, les champs de production de semences sont éloignés des autres champs de production de *pigeonpea* (à peu près de 300 mètres) et entourés de haies coupe vent, empêchant le transport d'autre pollen. Le  $F_{IS}$  des accessions africaines (0,3310) montre aussi une valeur positive, ce qui indique qu'il existe un léger déficit d'hétérozygotie dans ces accessions.

**Tableau 48** : Estimation de *F-Statistiques* de Wright chez 7 groupes des accessions de *pigeonpea* d'origine différente.

Accessions	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
Péruviennes	0,0223	0,3653 (*)	0,3509 (*)
ISO10	0,4483 (*)	-	-
Prompex2000	-0,0959	-	-
Indiennes	0,1157	0,4121 (*)	0,3351 (*)
Africaines	0,3310 (*)	0,5043 (*)	0,2590 (*)
Equatoriennes	-0,0756	0,0490	0,1159 (*)
Forêt	0,0909	-	-
<b>Total</b>	<b>0,1493 (*)</b>	<b>0,4784 (*)</b>	<b>0,3869 (*)</b>

$F_{IS}$  = Le coefficient de consanguinité

$F_{IT}$  = La déviation des fréquences génotypiques

$F_{ST}$  = L'indice de fixation

(\*) =  $p$  inférieur à 0,05 alors  $H_0$  rejetée et  $H_1$  acceptée. La valeur observée est significativement différent d'une distribution statistiquement aléatoire et donc nous pouvons la prendre en compte

Le  $F_{ST}$  correspond à la séparation génétique entre variétés. Cet indice mesure la réduction relative des hétérozygotes, lié aux différences alléliques entre sous-populations. C'est un indice de diversification des populations. Si les sous-populations sont identiques,  $F_{ST}=0$ .

Les valeurs du  $F_{ST}$  peuvent aller de :

0 à 0,05 : faible,

0,05 à 0,15 modérée,

0,15 à 0,25 importante et au delà, très importante ;

Dans notre étude, la différenciation génétique chez les accessions d'origine péruvienne ( $F_{ST}=0,3509$ ), chez les accessions d'origine indienne ( $F_{ST}=0,3351$ ) et chez les accessions africaines ( $F_{ST}=0,2590$ ) est très forte, tandis que la différenciation génétique chez les accessions équatoriennes est modérée ( $F_{ST}=0,1159$ ).

Le  $F_{IT}$  est le coefficient global de la consanguinité. Il reprend les effets de la consanguinité intra-varietal ( $F_{IS}$ ) et de la subdivision inter-varietal ( $F_{ST}$ ).

Ouedraogo (2003), a également étudié à l'aide des marqueurs microsatellites, la diversité génétique de *Phaseolus lunatus* L. var. silvestre originaire de la vallée centrale du Costa Rica, espèce autogame avec une allogamie facultative. Dans cette étude, les marqueurs microsatellites montrent un haut niveau de consanguinité pour l'ensemble des populations ( $F_{IT}=0,945$ ) et pour les sous-populations ( $F_{IS}=0,916$ ).



Dans cette même étude, chez *Phaseolus lunatus*, la différenciation génétique entre les populations  $F_{ST}$  est égale à 0,346, une valeur légèrement inférieure à celle obtenue pour les populations péruviennes ( $F_{ST}= 0,405$ ), indiennes ( $F_{ST}= 0,406$ ), africaines ( $F_{ST}= 0,351$ ), mais supérieure à celle des accessions équatoriennes ( $F_{ST}= 0,141$ ).

### 3.3.2 Indice de diversité de Nei

Le logiciel POPGEN version 3.2 (Yeh et al. 1999) a été utilisé pour calculer les indices de diversité de Nei, donc la diversité génétique totale ( $H_T$ ) est la diversité génique de l'ensemble des populations. Celle-ci est la somme de la diversité génique intra-population ( $H_S$ ) et la diversité inter-population ( $D_{ST}$ ) (Crossa et al., 1993). Le coefficient de différenciation génique ( $G_{ST}$ ) traduit la proportion de la diversité génétique totale due à la variabilité inter-population.

Pour les accessions étudiées, les indices de diversité de Nei montrent que la diversité génétique est due plus à la diversité génétique intra-population ( $H_S=0,2978$ ) qu'à la diversité inter-population ( $D_{ST}=0,1468$ ) (tableau 49).

**Tableau 49** : Indices de diversité de Nei par locus dans l'ensemble des groupes des accessions d'origine différente chez le *pigeonpea*.

Locus	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
Moyenne	0,4446	0,2978	0,1468	0,3302

La diversité génique totale ( $H_T$ )

La diversité génétique intra-population ( $H_S$ )

La diversité génétique inter-population ( $D_{ST}$ )

Coefficient de différenciation génétique ( $G_{ST}$ )

Dans l'étude de Ouedraogo (2003), chez *Phaseolus lunatus*, les marqueurs microsatellites ont mis en évidence une plus petite diversité génétique totale ( $H_T= 0,220$ ) au sein des populations sauvages et également une diversité génétique intra-population ( $H_S= 0,153$ ) inférieure par rapport aux valeurs estimées dans notre étude. Par contre, la contribution de 30% de la diversité génique inter-population ( $G_{ST}$ ) est semblable à celle calculée de notre étude.

### 3.3.3 Flux de gènes

Le flux de gènes indique les échanges unidirectionnels ou bidirectionnels de gènes par migration entre les populations. Le flux de gènes ( $N_m$ ) joue un rôle important dans la différenciation des populations (Zhao, 2006). Il montre le mouvement des gènes entre différents pools génétiques (Slatkin, 1985) ayant comme résultat final l'homogénéisation des fréquences alléliques entre les populations.

L'estimation de ce paramètre peut se faire indirectement à l'aide de l'indice de fixation ( $F_{ST}$ ) de Wright, sur les hypothèses d'absence de

sélection et une situation d'équilibre entre la dérive génétique et le flux de gènes. La différenciation génétique entre les populations est inversement liée au flux de gènes qui existe entre elles.

Dans notre étude, le flux de gènes est faible dans tous les groupes à l'exception de celui de l'équatorien (**tableau 50**). Ce flux est faible quand il y a une forte différenciation entre les accessions ( $F_{ST}$  élevé); comme on l'a constaté dans le point 3.4.1 (page 187), la différenciation génétique chez les accessions d'origine péruvienne, indienne et africaines est très forte. Un faible flux des gènes peut être partiellement expliqué par une grande distance entre les accessions ainsi que par les barrières physiques et physiologiques.

On constate également que le flux de gènes est élevé chez les accessions d'origine équatorienne (1,523). Ceci peut s'expliquer par les cycles de recombinaisons avec des variétés indiennes lors du processus d'amélioration. (Camarena et al., 1997).

**Tableau 50:** Estimation du flux des gènes ( $N_m$ ) chez le groupe péruvien, indien africain et équatorien chez le *pigeonpea*.

Accessions	$N_m$
Péruviennes	0,367
Indiennes	0,367
Africaines	0,463
Equatoriennes	1,523

$N_m$  = Estimation de flux des gènes

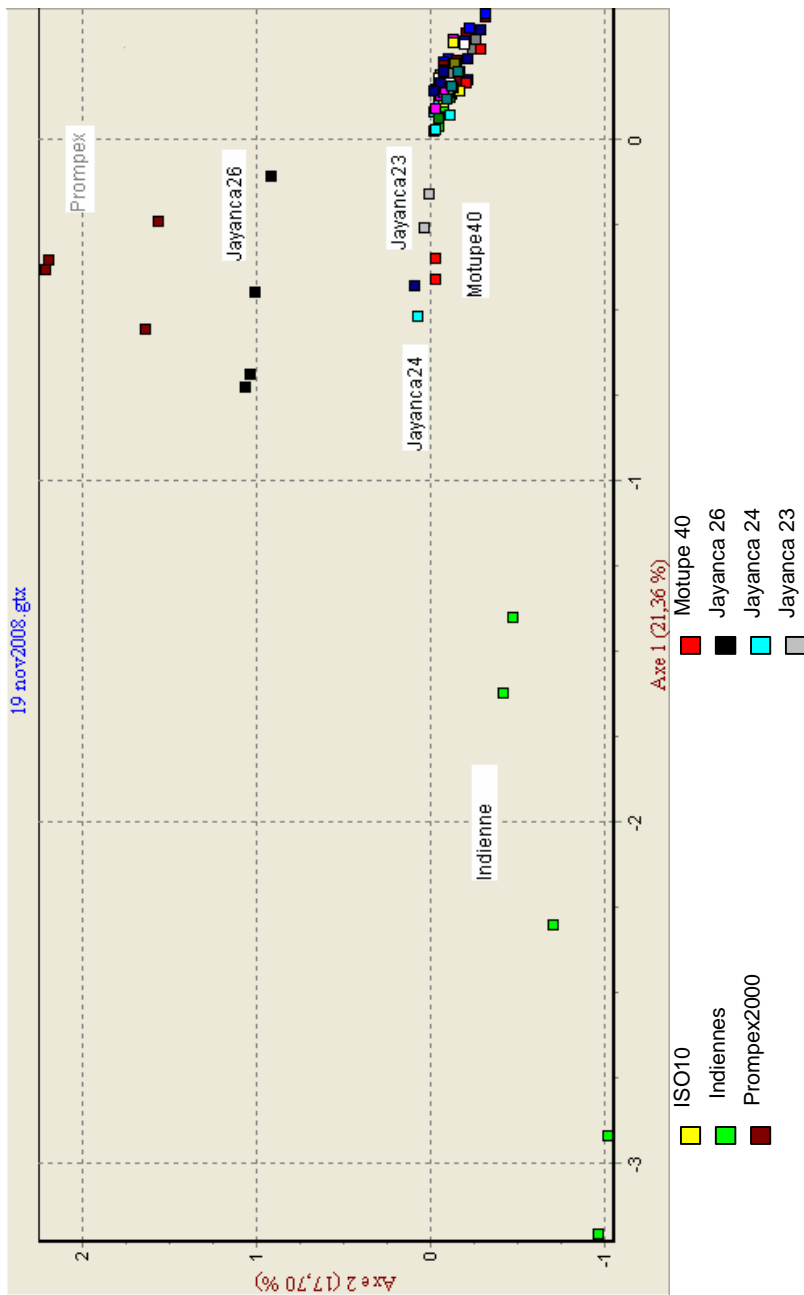
### 3.3.4 Etude des ressemblances entre accessions

#### 3.3.4.1 Analyse factorielle AFC (Analyse factorielle de correspondances)

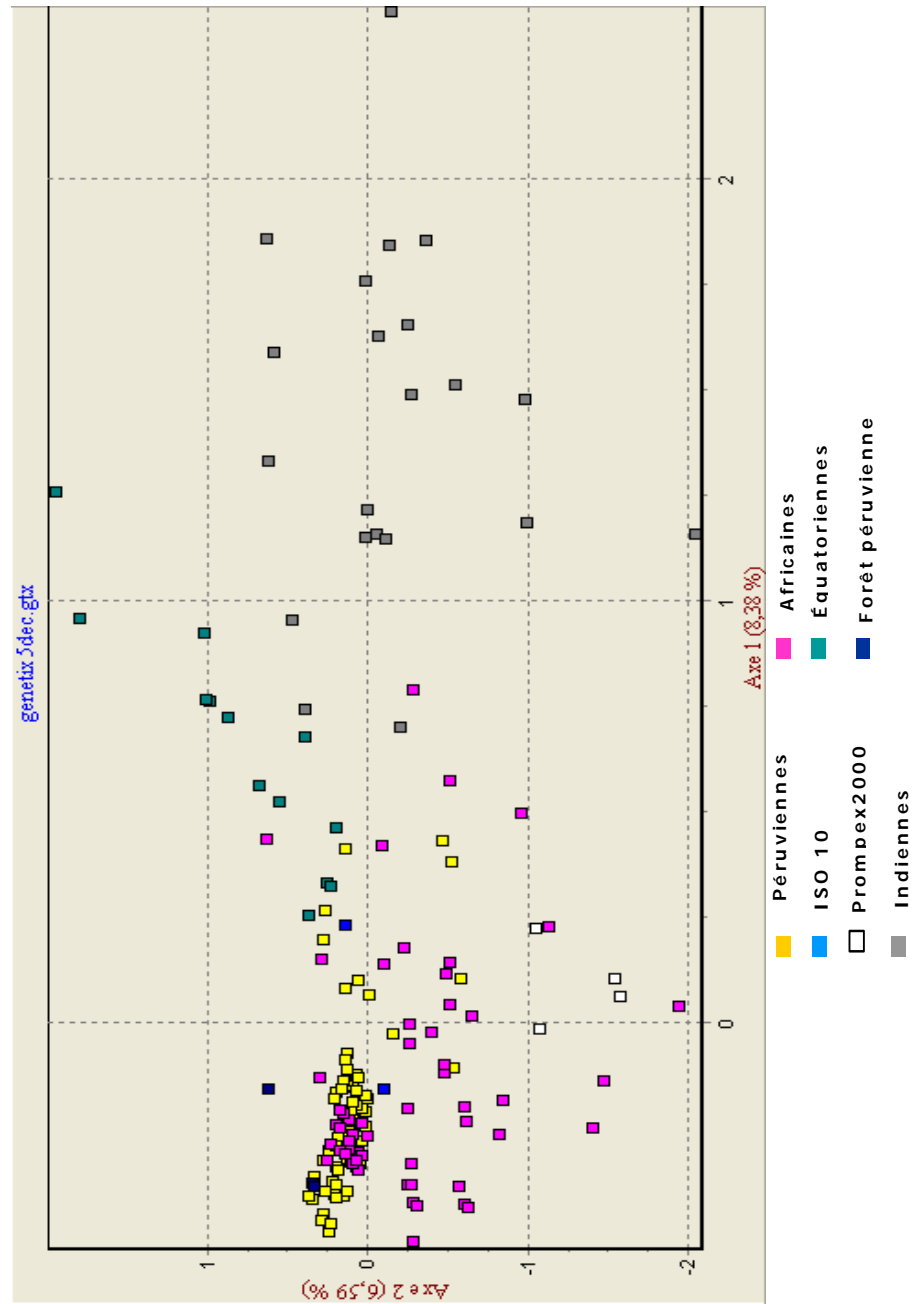
Tout d'abord, une analyse factorielle AFC (analyse factorielle de correspondances) a été réalisée à l'aide du logiciel GENETIX 4.05.2. Le pool péruvien face aux variétés améliorées et une variété indienne (ICPL 94008) (**figure 84**) ont été analysés. Le but de l'AFC est de réaliser une analyse des critères explicatifs des différences entre individus. L'AFC a permis de mettre en évidence l'éloignement de la variété indienne du pool péruvien. On a pu constater également le rapprochement de la variété améliorée Prompex2000 et de l'accession Jayanca26. On a également observé que les accessions Jayanca23, Jayanca24 et Motupe40 se distinguent du groupe des accessions péruviennes. On peut voir sur l'axe X deux groupes éloignés. On pourrait expliquer la différence de ces deux groupes par leur origine (indienne et péruvienne).

La même analyse factorielle AFC a été réalisée pour l'ensemble des accessions de différentes origines (péruviennes, africaines, améliorées, indiennes et équatoriennes) (**figure 85**). L'AFC a permis de mettre en évidence le rapprochement entre les pools génétiques péruviens et africains. Cette représentation a aussi permis de mettre en évidence l'éloignement du pool indien.

On peut voir également sur l'axe X l'écartement des deux groupes (indiennes et américaine). Sur l'axe Y, on distingue les accessions non irriguées (équatoriennes) positionnées dans la partie positive de l'axe. Tandis que les accessions irriguées se situent dans la partie plus proche du zéro et dans la partie négative de l'axe.



**Figure 84:** Analyse factorielle AFC des accessions péruviennes, améliorées et indiennes chez le *pigeonpea*. Logiciel GENETIX 4.05.2



**Figure 85:** Analyse factorielle AFC de 6 groupes des accessions de différentes origines chez le *pigeonpea*. Logiciel GENETIX 4.05.2

### 3.3.4.2 Distance génétique entre les groupes d'accessions

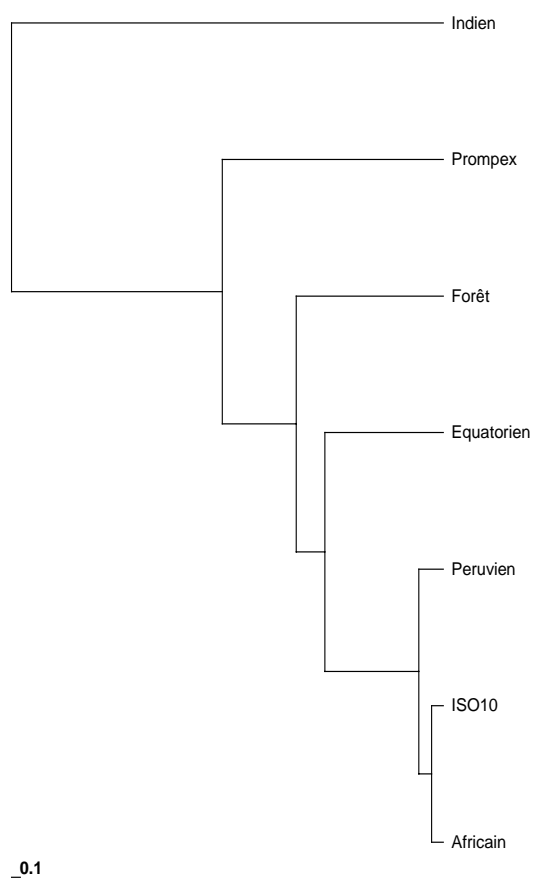
Pour compléter cette approche, on a analysé les ressemblances entre les accessions sur base de la distance génétique entre groupes d'accessions d'origines différentes ainsi qu'entre les accessions péruviennes. La distance  $d\mu^2$  a été utilisée, dans cette analyse, le degré d'éloignement tient compte de la différence de taille des allèles, ce qui correspond à l'hypothèse d'évolution de ce type de marqueurs utilisés. Le logiciel SPAGeDi (Hardy et Vekemans (2002) a été utilisé pour calculer les distances  $d\mu^2$ . C'est un logiciel qui estime les distances génétiques entre accessions sur base des données de marqueurs génétiques co-dominants.

La matrice des distances entre les 7 groupes d'accessions de la même origine (**tableau 50**) montre un rapprochement entre le groupe péruvien et le groupe africain ce qui indique une distance plus courte (0,449) et un plus grand éloignement avec le groupe indien (7,105). Ce qui veut dire que le groupe péruvien est plus proche du groupe africain que du groupe indien. La variété améliorée ISO10 est plus proche du groupe péruvien, en raison de son origine. En effet, elle est issue d'une sélection individuelle d'une *landrace* traditionnelle.

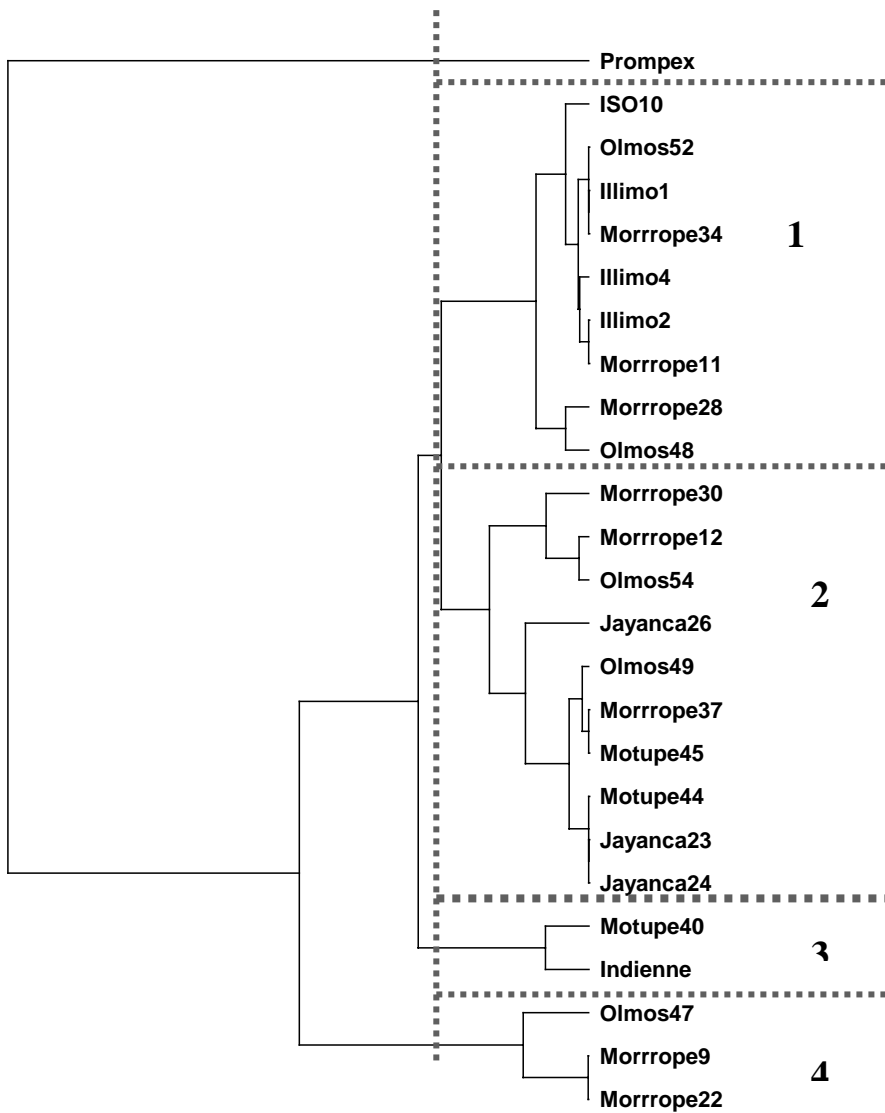
**Tableau 51:** Matrice de distances génétiques  $d\mu^2$  (Goldstein and Pollok, 1997) chez 7 groupes d'accessions de *pigeonpea*.

Accessions	Péru-vie- nnes	ISO10	Prompex 2000	Indien nes	Africai- nes	Equato rien- nes	Forêt
Péruviennes	0,000						
ISO10	0 ,655	0,000					
Prompex 2000	4 ,536	4 ,087	0,000				
Indiennes	7 ,105	8 ,847	7 ,482	0,000			
Africaines	0 ,449	0 ,264	3 ,534	6 ,972	0,000		
Equatorie- nnes	3 ,090	2 ,477	3 ,258	14 ,299	2 ,452	0,000	
Forêt	3 ,046	3 ,930	9 ,543	13 ,809	2 ,866	3 ,442	0,000

La figure 86 représente le regroupement des d'accessions de *pigeonpea* sur la base des distances  $d\mu^2$ .



**Figure 86** : Dendrogramme de distances génétiques  $d\mu^2$  avec 7 groupes d'accessions d'origine différente chez le *pigeonpea*.



0.1

**Figure 87** : Dendrogramme de distances génétiques  $du^2$  de accessions péruviennes, variétés améliorées chez le *pigeonpea*.

D'autre part, chez le pool péruvien (**figure 87**), on constate 4 clusters où la formation de ces groupes peut obéir à des caractéristiques communes des loci microsatellites. La variété Prompex2000 se place à l'écart des autres.

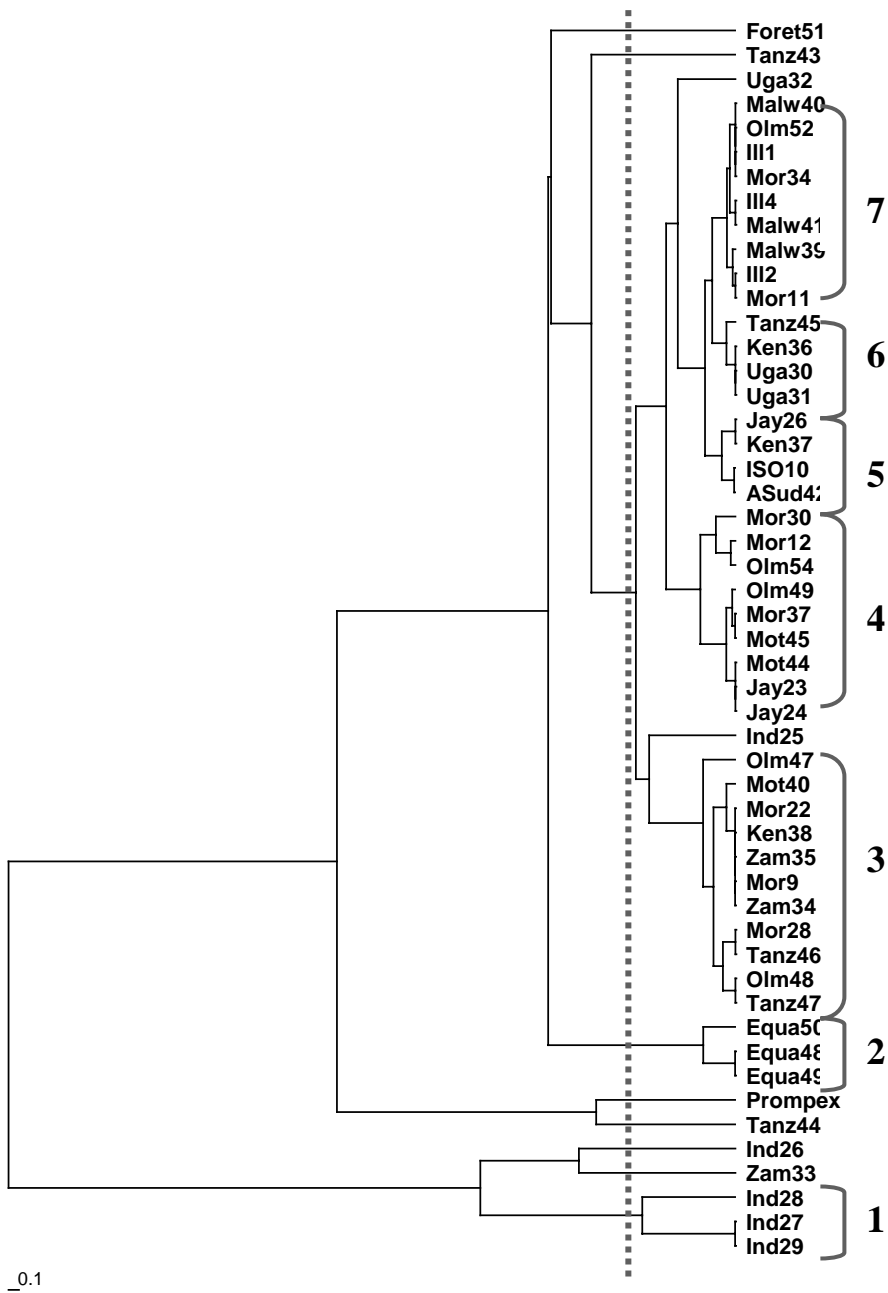
- Le cluster 1 constitué par la variété ISO10 et les accessions Olmos52, Illimo1, Morrope34, Illimo4, Illimo2, Morrope11, Morrope28, et Olmos48.



- Le cluster 2 constitué par les accessions Morrope30, Morrope12 Olmos54, Jayanca26, Olmos49, Morrope37, Motupe45, Motupe44, Jayanca23, et Jayanca24.
- Le cluster 3 : formé par Motupe40 et variété indienne.
- Le cluster 4 : formé par Olmos47, Morrope9 et Morrope22.

Quand on analyse tous les pools ensemble (**figure 88**) on constate que les 51 populations de 7 groupes d'origine différente ont été classe en 3 clusters.

- Le cluster 1, formé par les accessions Indiennes.
- Le cluster 2, formés par les accessions équatoriennes.
- Le cluster 3 par les accessions péruviennes et africaines.
- Le cluster 4 par des accessions péruviennes.
- Les clusters 5 et 6 par des accessions africaines.
- Le cluster 7 par des accessions péruviennes et africaines.



**Figure 88** : Dendrogramme de distances génétiques de 51 populations d'origine différente chez le *pigeonpea*.

### 3.4 Analyse de la structure génétique des populations

Finalement, l'analyse moléculaire de la variance pour les accessions de chaque groupe d'origines différentes a été réalisée par le logiciel GenAlEx V6 (Peakall et Smouse, 2006).

Afin d'évaluer la variabilité des accessions, une analyse moléculaire de la variance AMOVA a été réalisée pour des accessions de chaque groupe d'origine différente.

Le résultat de l'analyse de variance pour les 22 accessions constituées de 110 génotypes d'origine péruvienne a montré que 48 % de la variabilité proviennent de la variabilité intra-populations et 52% de la variabilité entre populations (**tableau 51**).

**Tableau 51:** Analyse moléculaire de la variance de 22 accessions péruviennes de *pigeonpea*.

Source de variabilité	dl	CM	Variance	%
Entre populations	21	9,707	1,639	52%
Intra-population	88	1,511	1,511	48%
Total	109	11,219	3,151	

dl: degré de liberté. CM: carré moyen. % pourcentage de variabilité.

\*\* effet significatif avec une probabilité de 1%.

Un résumé des analyses moléculaires de la variance AMOVA se présente dans le **tableau 52**. Les AMOVA ont été réalisées pour les accessions de chaque groupe d'origine différente.

Pour tous les pools étudiés la variabilité totale est due à la variabilité intra-populations et inter-populations dans la même proportion. Pour les pools africains et équatoriens la variabilité provient davantage de la variabilité intra-population que de la variabilité inter-population, contrairement aux variétés améliorées où la variabilité est due aux différences entre elles.

**Tableau 52 :** Variabilité intra et inter populations dans les pools de différents origines.

Origine du Pool	% de variabilité intra-population	% de variabilité inter-population
Péruvien	48	52
Indien	51	49
Africain	65	35
Equatorien	78	35
Vars améliorés	36	64
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>53</b>

La limitation principale des techniques de caractérisation moléculaire est le faible polymorphisme détecté parmi des cultivars étroitement liés, la collection de *pigeonpea* évaluée montre cette difficulté.

En raison de l'allogamie, les accessions de *pigeonpea* sont hétérogènes pour plusieurs caractères agronomiques importants.

Le maintien du germoplasme chez le *pigeonpea* étant difficile, l'identification des accessions par marqueurs moléculaires sera utile et permettra d'évaluer la pureté et la stabilité des génotypes dans le programme de multiplication.

Le développement des loci microsatellites chez le *pigeonpea* est censé faciliter l'évaluation rapide du flux de gènes entre les populations, permettant de surveiller son taux d'érosion génétique, et le développement de stratégies d'évaluation des risques d'érosion.

### 3.5 Conclusions

On a mis en évidence la diversité allélique présente dans les pools de différentes origines. L'analyse des fréquences alléliques a montré que tous les allèles ne sont pas présents dans tous les groupes.

Les analyses AFC ont permis de mettre en évidence le rapprochement entre les pools génétiques péruviens et africains, ainsi que l'éloignement du pool indien.

On a constaté que la variété ISO10 possède une tendance à l'autogamie. Ceci est dû principalement au fait que c'est une variété commerciale issue d'une sélection individuelle qui a besoin d'assurer l'autofécondation et d'empêcher l'allogamie dans le but de conserver sa pureté.

Le  $F_{IS}$  des accessions africaines (0,3310) montre aussi une valeur positive, ce qui indique qu'il existe un léger déficit d'hétérozygotie dans ces accessions..

Les ACP révèlent que la variété améliorée Prompex2000 d'origine multi-parentale, est plus proche du pool indien que du pool péruvien. Ce qui pourrait s'expliquer par son origine multi-parentale.

Dans notre étude, la différenciation génétique chez les accessions d'origine péruvienne, chez les accessions d'origine indienne et chez les accessions africaines est très forte, tandis que la différenciation génétique chez les accessions équatoriennes est modérée.

Dans notre étude, la différenciation génétique chez les accessions d'origine péruvienne ( $F_{ST}=0,3509$ ), chez les accessions d'origine indienne ( $F_{ST}=0,3351$ ) et chez les accessions africaines ( $F_{ST}=0,2590$ ) est très forte, tandis que la différenciation génétique chez les accessions équatoriennes est modérée ( $F_{ST}=0,1159$ ).

Pour tous les pools étudiés, la variabilité totale est due à la variabilité intra-populations et inter-populations dans la même proportion. Pour les pools africains et équatoriens, la variabilité provient d'avantage de

la variabilité intra-population que de la variabilité inter-population. Et contrairement aux variétés améliorées, la variabilité est plus forte entre les variétés améliorées qu'à l'intérieur de celles-ci.

L'effet fondateur peut expliquer en partie la diversité trouvée lors des analyses phénotypiques et moléculaires de la collection de *pigeonpea* étudiée. Lorsqu'un nombre réduit d'individus s'est séparé d'une population plus vaste pour coloniser un nouveau milieu, ces individus ne vont "emporter" qu'un échantillon du pool d'allèles de la population mère, et ce, de manière que l'on suppose aléatoire. La nouvelle population peut donc présenter des fréquences génotypiques fortement différentes de la population initiale. Cet écart peut changer radicalement le profil (allélique, génotypique et phénotypique) de la population fondatrice, par rapport à la population initiale.

## SYNTHESE DES RESULTATS

Au Pérou, le *pigeonpea* montre une plasticité d'adaptation à des conditions défavorables plus élevée que d'autres cultures. Une large variabilité phénotypique a été détectée et échantillonnée en champ chez de petits agriculteurs. La question s'est posée de savoir dans quelle mesure la variabilité phénotypique observable pouvait aussi correspondre à une variabilité génotypique. Plusieurs éléments sont présentés pour y répondre.

Afin de caractériser la collection ainsi réalisée de *landraces* péruviennes de *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L.) Millps), deux approches ont été mises en oeuvre. Une approche phénotypique, basée sur des descripteurs agro-morphologiques et une approche moléculaire, basée sur des marqueurs moléculaires de type microsatellite.

Dans les paragraphes qui suivent, nous présentons une synthèse de la caractérisation obtenue par ces deux types d'analyses.

### 1. **Synthèse de la caractérisation agro-morphologique**

Une collection caractérisée constitue une richesse pour les programmes d'amélioration végétale. La mesure de la variabilité, la structuration des populations et le flux des gènes permettent en effet de réaliser une meilleure gestion du germoplasme à la base de la sélection.

On a pu constater que cette variabilité est conservée dans les jardins potagers de petites exploitations péruviennes, malgré la part croissante de la culture du *pigeonpea* pour l'exportation. Ces deux types de systèmes de culture se développent parallèlement et les barrières physiques entre elles sont de plus en plus courtes. Les mesures qu'encouragent la conservation *in-situ* des *landraces* adaptées et le maintien dans des champs d'agriculteurs doivent être prise en compte dans des programmes d'amélioration génétique.

En vue de rassembler la variabilité phénotypique du *pigeonpea* au Pérou, notre attention s'est portée sur le système d'agriculture de subsistance des petits paysans de la côte nord, dans le département de Lambayeque, plus précisément. C'est dans cette région que les *landraces* locales sont les plus menacées par l'extension rapide des variétés améliorées ainsi que par l'influence des sociétés d'exportation qui fournissent des semences aux agriculteurs.

Une étude précédente faite par Verschueren (1992) dans le département de Piura, nous a permis d'orienter la prospection en suivant un parcours logique d'introduction, à partir du noyau de diversité établi par cette étude, vers la zone de production du *pigeonpea* du département de

Lambayeque. Cette zone est caractérisée par des conditions de sécheresse et de salinité qui ont exercé une pression de sélection naturelle.

La collecte a été réalisée en essayant d'échantillonner toute la variabilité observable sur base de descripteurs qualitatifs hautement héréditaires, comme les couleurs primaire et secondaire de la gousse et de la graine et la forme de la gousse et de la graine, principalement.

La variabilité observée pourrait s'expliquer par l'habitude des agriculteurs de conserver les graines aux champs, culture après culture sans les sélectionner, pour au contraire en augmenter la diversité. Cette pratique apprise et pratiquée de génération en génération est propre à la culture pré-hispanique et appliquée à d'autres cultures de la zone.

Afin d'évaluer la variabilité collectée, des populations issues de ces génotypes ont été formées. D'autres populations d'origines équatorienne, indienne et africaine se sont ajoutées à notre évaluation. La caractérisation agro-morphologique a pris en compte 32 descripteurs, dont seuls sept descripteurs qualitatifs et huit descripteurs quantitatifs se sont avérés les plus importants puisque ce sont ceux qui peuvent expliquer la plupart de la variabilité observée.

On a mis en évidence une forte corrélation positive du nombre de jours à la floraison avec la taille de la plante, le diamètre de la tige, le nombre de branches et une corrélation négative avec le poids de 100 graines. Les plantes tardives ont donc une croissance plus forte, une tendance à développer une plus grande ramification et une tendance vers une graine de plus petite taille.

Accessoirement, on a pu constater une forte ressemblance des caractères de l'accession péruvienne Jayanca26 et de la variété améliorée Prompex2000, ce qui sera confirmé par l'approche moléculaire.

On a mis en évidence la présence de deux groupes contrastés : le groupe un comprenant des accessions tardives et semi-tardives, de grande taille et de rendement élevé, et le groupe deux comprenant des accessions précoces, de faible taille et de bas rendement, avec un grand nombre de grains par gousse et des gousses longues (Jayanca26, Illimo1, Illimo2).

## **2. Synthèse de la caractérisation moléculaire**

L'approche moléculaire a été basée sur des marqueurs moléculaires de type microsatellite, polymorphes et d'utilisation facile, malgré une mise au point longue et coûteuse.

Leur distribution sur l'ensemble du génome, leur polymorphisme extrêmement élevé du nombre de répétitions, leur spécificité de locus, leur caractère co-dominant (on peut distinguer l'homozygote et l'hétérozygote) et leur simplicité d'utilisation, une fois leur mise au point effectuée, fait d'eux d'excellents marqueurs génétiques.

Les microsatellites sont fortement reproductibles, fortement polymorphes, basés sur la PCR, ils ne nécessitent que de petites quantités d'ADN (Edwards *et al.*, 1996). De même les microsatellites sont de nature multi-allélique, de transmission co-dominante, ils se retrouvent en abondance relative (Zane *et al.*, 2002).

De 49% de clones positifs lors du criblage, 13,5% contenaient des séquences microsatellites. A partir de 13 clones contenant des séquences utilisables, un total de sept paires d'amorces a été conçu après rejet de six clones. Alors que l'amplification de ces sept microsatellites a été possible, trois d'entre eux seulement ont montré du polymorphisme dans les échantillons des accessions d'origine péruvienne, africaine et indienne. Finalement, seul le microsatellite le plus polymorphe, un GA<sub>12</sub> avec quatre allèles autour de 100 à 107pb, a été retenu pour le génotypage de la collection.

Au total, 49 paires d'amorces ont été utilisées. Tout d'abord les sept paires d'amorces microsatellites mentionnées dans le paragraphe précédent. Ensuite, neuf paires d'amorces microsatellites publiées par Burns (2001) ont été testées : CCB10, CCB9, CCB8, CCB7, CCB6, CCB5, CCB4, CCB2 et CCB1. De la même façon huit paires d'amorces définies au départ des séquences de *Cajanus* disponibles dans la base de données NCBI ont été utilisées (Odeny, 2007). Finalement, 25 paires d'amorces fournies par l'ICRISAT ont été testées. Au terme de tests préliminaires, seules 19 paires d'amorces ont été retenues et évaluées pour leur polymorphisme. Lors de la caractérisation moléculaire seuls sept loci microsatellites se sont avérés polymorphes.

Les marqueurs génétiques moléculaires traduisent des structures de diversité générale qui peuvent à leur tour servir de base pour construire une «core collection». En effet, les marqueurs révèlent parfois des groupes d'accessions partiellement isolés les uns des autres, qui peuvent avoir fixé des allèles distincts pour des caractères utiles, par effet de fondation, par dérive génétique ou encore sous l'action de différentes pressions de sélection.

L'effet fondateur peut expliquer, en partie, la diversité trouvée lors des analyses phénotypiques et moléculaires de la collection de *pigeonpea* étudiée. Lorsqu'un nombre réduit d'individus s'est séparé d'une population plus vaste pour coloniser un nouveau milieu, ces individus ne vont "emporter" qu'un échantillon du pool d'allèles de la population mère, et ce, de manière que l'on suppose aléatoire. La nouvelle population peut donc présenter des fréquences génotypiques fortement différentes de la population initiale. Cet écart peut changer radicalement le profil (allélique, génotypique et phénotypique) de la population fondatrice, par rapport à la population.



On a pu constater le partage d'allèles entre le pool péruvien et africain, ce que pourrait confirmer l'origine africaine du *pigeonpea* du Pérou. De plus, l'analyse de la diversité a permis mettre en évidence l'éloignement du pool indien. Incidemment, on a constaté que la variété ISO10 montre un déficit d'hétérozygotie dû à une haute consanguinité au sein de cette variété. Cela pourrait s'expliquer par la pratique de contrôle de la pollinisation que l'on utilise dans la production de semences de cette variété commerciale dans le but de conserver sa pureté. De plus, les champs de production de semences sont éloignés des autres champs de production de *pigeonpea*.

La variété améliorée Prompex2000 issue de croisements multiparentaux s'approche plus du pool indien que du pool péruvien.

Pour toutes les accessions étudiées, les indices de diversité de Nei ont montré que la diversité génétique était davantage due à la diversité génétique intra-population qu'à la diversité inter-population, résultat semblable à ceux trouvés chez *Phaseolus lunatus* Ouedraogo (2003),

On a mis en évidence le rapprochement entre l'accession Jayanca26 et la variété améliorée Prompex2000. Leur ressemblance nous permet d'affirmer que cette variété améliorée est en train de déplacer les *landraces* locales, pour preuve les ressemblances moléculaires trouvées chez ces deux accessions. Si les études agro-morphologiques nous permettent de présumer d'une ressemblance ou s'il s'agissait d'un ré-échantillonnage de Prompex2000, l'étude moléculaire nous dit qu'elles sont différentes moléculairement mais que ces variétés partagent des allèles.

### **3. Corrélation entre la caractérisation phénotypique et la caractérisation moléculaire**

Les relations entre les deux niveaux de variabilité, celui des marqueurs génétiques moléculaires et celui des caractères agronomiques, sont mal connues. Ces relations varient probablement en fonction de la structure des populations. Elles sont généralement fortes s'il existe des déséquilibres gamétiques forts.

Afin d'évaluer la relation entre les deux types d'analyses, un test de Mantel a été effectué. Il permet de tester la corrélation entre deux matrices en permutant au hasard les données pour arriver à obtenir un coefficient de corrélation de Pearson et sa significativité.

Les distances utilisées ont été la distance euclidienne pour les données phénotypiques et la distance  $d_j^2$  pour les données moléculaires. Le test a été limité aux *landraces* péruviennes, les variétés améliorées Prompex2000 et ISO10 et une variété indienne (moyenne d'accession). Ce

sont les seules accessions que on été caractérisées agro-morphologiquement et moléculairement.

Le test n'a révélé aucune correspondance entre les marqueurs analysés et les caractères agro-morphologiques étudiés; on peut en conclure qu'il existe une complémentarité entre les deux types d'analyses et qu'il n'est donc pas possible d'inférer une analyse au départ de l'autre. Un coefficient de Pearson  $r=0,017$  a été obtenu avec une  $p$ value de 77,13% a un seuil de signification alpha de 0,05.

Tandis que l'expression du phénotype peut être influencée par l'environnement, les tests moléculaires nous donnent une preuve incontestable de la variabilité conservée dans les *landraces* péruviennes, et l'apparition d'allèles uniques absents dans les autres pools indien et africain.



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

### 1. Conclusion générale

La collecte réalisée au cours de ce travail a permis une prospection d'une surface d'environ 1.015 hectares à *Lambayeque* au nord du Pérou. Cette région se caractérise par des conditions de sécheresse et de salinité propre à la côte péruvienne.

Cette étude a contribué à constituer une collection centralisée de génotypes qui permettra de conserver et d'utiliser les matériels génétiques adaptés aux conditions agronomiques et socio-économiques de la côte nord péruvienne dans une récolte orientée vers la production de grain vert.

Au-delà des actions de conservation, l'établissement à Lima d'une large collection de cultivars de *pigeonpea* et l'application des techniques modernes d'identification et de caractérisation variétale ouvrent la voie à la sélection assistée par marqueurs moléculaires.

Notre étude nous a permis de contribuer à une meilleure connaissance de l'espèce qui nous permettra de la valoriser et de la conserver.

De plus cette étude devrait contribuer à la production de nouvelles variétés de *pigeonpea* dont la surface cultivée pourrait s'étendre à des régions plus sèches, dans des sols présentant des problèmes de salinité, et en raccourcissant le cycle de la culture.

L'analyse de diversité nous a permis mettre en évidence le rapprochement entre les pools génétiques péruviens et africains, ainsi que l'éloignement du pool indien.

Tandis que l'expression du phénotype peut être influencée par l'environnement, les tests moléculaires nous donnent la preuve de la variabilité conservée dans les *landraces* péruviennes ainsi que l'apparition d'allèles uniques absents dans les autres pools indien et africain.

De plus, cette étude a permis de concrétiser les efforts isolés de diverses institutions péruviennes en vue de conserver et d'utiliser les nombreuses *landraces* de *pigeonpea*.

D'autre part la méthode rapide d'extraction d'ADN (*phytoPASS*), nous a permis d'échantillonner efficacement la collection, de l'envoyer facilement et d'extraire l'ADN en qualité et quantité suffisantes à bas prix.

## **2. Perspectives**

Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude, qui ont permis l'analyse de la diversité de la collection, seront disponibles pour les analyses futures d'autres accessions ajoutées à la collection.

Le transfert de la technique des marqueurs microsatellites à l'UNALM (Lima-Pérou) pourra être fait dans le cadre de la sélection de variétés. La collaboration péruvienne au sein de l'Université Agronomique de La Molina (Lima-Pérou) est d'ores et déjà acquise à ce sujet.

Cette étude permettra de valoriser les *landraces* péruviennes et le système d'agriculture de petits paysans de la région qui assure le maintien de la variabilité *in situ*.

Un nombre plus élevé de marqueurs et d'individus permettrait de réaliser d'autres applications comme la recherche des gènes candidats liés à la résistance au stress hydrique et à la salinité, par exemple.

- Achaz, G. (2002). Etude de la dynamique des génomes: les répétitions intrachromosomiques. Ecole Doctoral Logique du vivant, l'Université Pierre & Marie Curie (Paris VI). 230pp.
- Adu-Gyamfi J.J., Fujita K. and Ogata S. (1990). Phosphorus fractions in relation to growth in *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L) Millsp.) at various levels of P supply. *Soil Sci Plant Nutr* 36: 531-543.
- Ahmad, F., A. E. Slinkard, 1992: Genetic relationships in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. *Theor Appl Genet* 84: 688–692.
- Ariyanayagam R.P., Nageshwar A. and Zaveri P.P. (1993). Cytoplasmic-genic male sterility in interspecific matings of *Cajanus* crop. *Crop Sci* 35: 981–985.
- Armour J.A., Neumann R., Gobert S. and Jeffreys A.J. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Hum Mol Genet* 3: 599-565.
- Barry M.B., Diagne A., Pham J.L. and Ahmadi N. (2007). Colloque international sur la gestion des ressources génétiques en zone de savanes d'Afrique de l'Ouest, Bamako, Mali, 15-18 mai 2007.
- Berg E. E. and Hamrick J. L. (1997). Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can J for Res* 27:415-424.
- Billotte N., Lagoda P.J.L., Risterucci A.-M. and Baurens F.-C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.
- Blair M.W., Pedraza F., Buendia H.F., Gaitán-Solís E., Beebe S.E., Gepts P. and Tohme J. (2003). Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 107: 1362-1374.
- Bolstein, D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314–331.
- Boshier D.H., Chase M.R. and Bawa K.S. (1995). Populations genetics of *Cordia alliodora* (Boragmaceae). A neotropical tree. 3 Gene flow, neighborhood, and population substructure. *Am J Bot* 82(4): 484-490.
- Briard M., Le Clerc V., Grzebelus D., Senalik D. and Simon P.W. (2000). Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain or radioisotopes. *Plant Mol Biol Rep* 18: 235-241.
- Burns M.J., Edwards K.J., Newbury H.J., Ford-Lloyd B.V. and Baggott C.D. (2001). Development of simple sequence repeats (SSR) markers for the assessment of gene flow and genetic diversity in *pigeonpea* (*Cajanus cajan*). *Mol Ecol Notes* 1(4): 283–285.
- Busogoro J.P., Masquellier L., Kummert J., Dutrecq O., Lepoivre P. and Jijakli M.H. (2008). Application of a Simplified Molecular Protocol to Reveal Mixed Infections with Begomoviruses in Cassava. *Journal of Phytopathology* 156(7-8): 452-457.

- Camarena Mayta F. and Bautista Salas A.M. (1997). Estimación de la efectividad y del avance genético. *Anales Científicos. UNALM.* 1(2): 9-10.
- Camarena Mayta F., Huarianga A. and Chiappe L. (1991). El cultivo de Frijol de palo (*Cajanus cajan*(L) Millsp.) Programa de Leguminosas de grano y oleginosas- UNALM, Lima Pérou, Boletín 5. 19pp.
- Charcosset A., Moreau L. (2004). Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. *Euphytica* 137: 81-94.
- Chen X., Temnykh S., Xu Y., Cho Y.G. and McCouch S.R. (1997). Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 95: 553-567.
- Chen D.-H. and Ronald P.C. (1999). A rapid DNA miniprep method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Mol Biol Rep* 17: 53-57.
- Crossa J., Hernandez C.M. Bretting P., Eberhart S.A. and Taba S. (1993). Statistical genetic considerations for maintaining germplasm collections. *Theor Appl Genet* 86: 673-678.
- Cuc L., Mace E., Crouch J., Quang V. Long T. and Varshney R. (2008). Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biology* 8: 55.
- Cui L., Fan Q., Hu Y., Karamycheva S.A., Quackenbush J., Khuntirat B., Sattabongkot J. and Carlton J.M. (2005). Gene discovery in *Plasmodium vivax* through sequencing of ESTs from mixed blood stages. *Mol Biochem Parasit* 144: 1-9.
- Chauvet M. (2001) Du voyage des plantes à la mondialisation des espèces cultivées. Ed. Mission Agrobiosciences. 14pp.
- Dekkers, J. C. M. and F. Hospital (2002). "The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations." *Nat Rev Genet* 3(1): 22-32.
- Djè Y., Forcioli D., Ater M., Lefèbvre C. and Vekemans X. (1999). Assessing population genetic structure of sorghum *landraces* from north-western Morocco using allozyme and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 99, p. 157-163.
- Djè Y., Heuertz M., Lefèbvre C. and Vekemans X. (2000). Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatellites markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, p. 918-925.
- Dolan R.W. (1994). Patterns of isozyme variation in relation to population size, isolation, and phytogeographic history in royal catchfly (*Silene regia*; Caryophyllaceae). *Am J Bot* 81: 965-972.
- Doligez A. (1996). Evolution de la diversité génétique intra-population et de la structure : étude d'un modèle de simulation spatialisé en vue de la gestion de ressources génétiques forestières tropicales. PhD thesis. Institut National Agronomique, Paris- Grignon. France. 273pp.

- Dundas I.S. (1990). *Pigeonpea*, cytology and cytogenetics – perspective and prospects. In: Nene YL, Hall SD, Sheila VK (eds) *The Pigeonpea*. CAB, Wallingford, UK. 117–136.
- Edwards K.J., Barker J.H.A, Daly A., Jones C. and Karp A. (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques* 20: 758-759.
- Ellegren, H. (2000). "Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference." *Trends in Genetics* 16(12): 551-558.
- Falconer D.S. (1989). *Introduction to quantitative genetics*. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 437pp.
- Falconer D.S. and Mackay T.F.C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. 4th edn. Longman Group, Essex, 464 pp.
- Falinska K. (1999). Seed bank dynamics in abandoned meadows during 20 years period in the Bialowieza National Park. *J Ecol* 87: 461-475.
- FAO (1996). Rapport sur l'état de ressources phytogénétiques dans le monde. Leipzig Allemagne. Conférence technique internationale sur ressources phytogénétiques. 88pp.
- FAO (2008) <http://www.fao.org/docrep/009/y5956f/Y5956F03.htm>
- FAOSTAT (2008). <http://faostat.fao.org/faostat>
- FAO (2006). Interactions du genre, de la biodiversité agricole et des savoirs locaux au service de la sécurité alimentaire - Manuel de formation. 190pp.
- Ferguson M.E., Burrow M.D., Schulze S.R., Bramel P.J., Paterson A.H., Kresovich S. and Mitchell S. (2004). Microsatellite identification in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor Appl Genet* 108: 1064-1070.
- Franco, T. L. and R. Hidalgo (2003). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Boletín técnico* n°8: 89.
- Fujita K., Kai Y., Takayanagi M., El-Shemy H., Adu-Gyamfi J.J. and Mohapatra P.K. (2004). Genotypic variability of *pigeonpea* in distribution of photosynthetic carbon at low phosphorus level. *Plant Sci* 166: 641-649.
- Gaitán-Solis E., Duque M.C., Edwards K.J. and Tohme J. (2002). Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterisation and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. *Crop Sci* 42: 2128-2136.
- Gao L., Tang J., Hongwei L. and Jia J. (2003). Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Mol Breed* 12: 245-261.
- Glenn T.C. and Schable N.A. (2005). Isolating microsatellite DNA loci. *Methods Enzymol* 395: 202-222.
- Godoy R., Batista L.A.R. and Negreiros G.F. (1994). Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). *R Bras Zootec* 23 (5): 742-749.



- Godoy R., Batista L.A.R. and Negreiros G.F. (1997). Avaliação agronômica e seleção de germoplasma de guandu forrageiro (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) proveniente da Índia. R Bras Zootec 26 (3): 447-453.
- Godoy R., Batista L.A.R., de Souza F.H. and Primavesi A.C. (2003). Caracterização de linhagens puras selecionadas de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). R Bras Zootec 32 (3): 546-555.
- Godoy R., Terumi A., Batista L.A.R. and de Souza, F.H. (2004). Caracterização de Onze Linhagens Puras Selecionadas de Guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). em São Carlos, SP. R Bras Zootec 33 (6): 2206-2213.
- Goldstein, D. B., and D. D. Pollock, 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and method for phylogenetic inference. Journal of Heredity 88: 335-342.
- Gonzales-Candelas F. and Palacios C. (1995). Analyzing molecular data for studies of genetic diversity. In: Ayad W.G. Hodgkin T. Jaradat A. and Rao V.R. (eds). Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI workshop. Rome, Italy. IPGRI. 55-80.
- Hamrick J.L. (1982). Plant population genetics and evolution Am J Bot 69: 1685-1693.
- Hamrick J.L. and Godt J.W. (1997). Allozyme diversity in cultivated crops. Crop Sci 37: 26-30.
- Hancock J.M. (1995). The contribution of slippage-like processes to genome evolution. J Mol Evol 41: 1038-1047.
- Hardy O.J. and Vekemans X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol Ecol Notes (2002). 2 : 618-620
- Hardon, J.J. and W.S. de Boef (1993) Linking farmers and breeders in local crop development. In: Cultivating Knowledge. Genetic diversity, farmer experimentation, and crop research, (edited by W. de Boef, K. Amanor, K. Wellard and A. Bebbington). Intermediate Technology Publications, London. 64-71.
- Hartl, D. L. (2000). A Primer of Population Genetics. 3 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 221 pp
- He G., Meng R., Newman M., Gao G., Pittman R.N. and Prakash C.S. (2003). Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). BMC Plant Biol 3: 3.
- Hedrick P.W. (1998). Maintenance of genetic polymorphism: spatial selection and self-fertilization. Am Nat 152: 145-150.
- Hedrick P.W. and Miller P.S. (1992). Conservation genetics : techniques and fundamentals. Ecol Appl 2: 30-46.
- Hoyt E. (1992). La conservation des plantes sauvages apparentes aux plantes cultivées. IBPGR/UICN/WWT/BRG. Rome, Italie. 51pp.
- Hyten D.L., Pantalone V.R., Sams C.E., Saxton A.M., Landau-Ellis D., Stefaniak T.R. and Schmidt M.E. (2004). Seed quality QTL in a prominent soybean population. Theor Appl Genet 109: 552-561.

- IBPGR and ICRISAT (1993). Descriptors for *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) International Board For Plant Genetic Resources, Rome, Italy; International Crop Research Institute For The Semi Arid Tropics, Patancheru, India. 31p.
- ICRISAT (2008). <http://www.icrisat.org/PigeonPea/PigeonPea.htm>
- INRA. (2008). [http://www.inra.fr/la\\_sciences\\_et\\_vous/dossiers\\_scientifiques/biodiversite/questions\\_de\\_recherche/ressources\\_genetiques\\_et\\_selection](http://www.inra.fr/la_sciences_et_vous/dossiers_scientifiques/biodiversite/questions_de_recherche/ressources_genetiques_et_selection)
- Jha S.S. and Ohri D. (1996). Phylogenetic relationships of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (*Pigeonpea*) and its wild relatives. Genet Resour Crop Evol 43: 275–281.
- Jones A.T., Kumar P.L., Saxena K.B., Kulkarni N.K., Muniyappa V. and Waliyar F. (2004). Sterility mosaic disease – the green plague of *pigeonpea* : advances in understanding the etiology, transmission and control of a major virus disease. Plant Dis 88: 436–445.
- Joshi, S.P., Ranjekar P.K., (1999). Molecular markers in plant genome analysis. Current Science 77(2): 230-240.
- Kalinowski S.T. (2004). Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. Conserv Genet 5: 539-543.
- Karagoyozov L., Kalcheva I.D. and Chapman V.M. (1993). Construction of random smallinsert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. Nucleic Acids Res 21: 3911-3912.
- Kollipara K.P., Singh L. and Hymowitz T. (1994). Genetic variation of trypsin and chymotrypsin inhibitors in *pigeonpea* , *Cajanus cajan* (L.) Millsp, and its wild relatives. Theor Appl Genet 88: 986–993.
- Krishna T.G. and Reddy L.J. (1982). Species affinities between *Cajanus cajan* and some *Atylosia* species based on esterase isozymes. Euphytica 31: 709-713.
- Lange D.A., Peñuela S., Denny R. L., Mudge J., Concibido V. C., Orf J.H. and Young N.D. (1998). A plant DNA isolation protocol suitable for polymerase chain reaction based marker-assisted breeding. Crop Sci 38: 217-220
- Laing D.R. (1977). Adaptacion del frijol comun (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Curso Intensivo de Adiestramiento de Producción de Fríjol para Investigadores en América Latina Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. 1:1-6.
- Lee J.M., Grant D., Vallejos C.E. and Shoemaker R.C. (2001). Genome organization in dicots. II. Arabidopsis as a 'bridging species' to resolve genome evolution events among legumes. Theor Appl Genet 103: 765-773.
- Levinson G.L. and Gutman G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. Mol Biol Evol 4: 203–221
- Li Y-C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A. and Nevo E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol Ecol 11: 2453-2465.

- Li, X., M. Lassner and Y. L. Zhang (2002). "Deleteagene: a fast neutron deletion mutagenesis-based gene knockout system for plants." *Comparative and Functional Genomics* 3(2): 158-160.
- Lichtenzweig J., Scheuring C., Dodge J. and Abbo S. (2005). Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR markers for genome analysis of chickpea, *Cicer arietinum* L. *Theor Appl Genet* 110: 492-510.
- Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Henaut and Burstin J. (2005). Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* 111: 1022-1031.
- Mallikarjuna N. and Moss J.P. (1995). Production of hybrids between *Cajanus platycarpus* and *Cajanus cajan*. *Euphytica* 83(1): 43-46.
- Mallikarjuna N. and Saxena K.B. (2002). Production of hybrids between *Cajanus acutifolius* and *Cajanus cajan*. *Euphytica* 124: 107-110.
- Mallikarjuna N. and Saxena K.B. (2005). A new cytoplasmic nuclear male-sterility system derived from cultivated *pigeonpea* cytoplasm. *Euphytica* 142: 143-148.
- Manly B.F.J.(1997). Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in Biology.: Chapman & Hall. London, UK. 341pp.
- Manyasa E.O., Silim S.N., Githiri S.M. and Christiansen J.L. (2008). Diversity in Tanzanian *pigeonpea* [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] landraces and their response to environments. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55 (3): 379-387.
- Marley P.S. and Hillocks R.J. (1996). Effect of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on Fusarium wilt in *pigeonpea* (*Cajanus cajan*). *Field Crop Res* 46: 15-20.
- Mba R.E.C., Stephenson P., Edwards K., Melzer S., Nkumbira J., Gullberg U., Apel K., Gale M., Tohme J. and Fregene M. (2001). Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theor Appl Genet* 102: 21-31.
- MINITAB Inc. (1998). Minitab version 15 Available on <http://www.minitab.com.support>.
- Minja E.M., Shanower T.G., Silim S.N. and Karuru O. (2000). Efficacy of different insecticides for *pigeonpea* pest management in Kenya. *ICPN* 7: 30-43.
- Mogg R., Batley J., Hanley S., Edwards D., O'Sullivan H. and Edwards K. (2002). Characterisation of the flanking regions of Zea mays microsatellites reveals a large number of useful sequence polymorphisms. *Theor Appl Genet* 105: 532-543.
- Mudge J., Cannon S.B., Kalo P., Oldroyd G.E.D., Roe B.A., Town C.D. and Young N.D. (2005). Highly syntenic regions in the genomes of soybean, Medicago truncatula, and Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* 5: 15.
- Nadimpalli R.G., Jarret J.L., Pathak S.C. and Kochert G. (1993). Phylogenetic relationships of *pigeonpea* (*Cajanus cajan*) based on

- nuclear restriction fragment length polymorphism. *Genome* 36: 216–223.
- Narvel J.M., Chu W-C., Fehr W.R., Cregan P.B. and Shoemaker R.C. (2000). Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. *Mol Breed* 6 (2): 175-183.
- Nei M. (1972). Genetic distance between populations. *Am Nat* 106 : 283-292.
- Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70 (12): 3321-3323
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. USA, 52pp.
- Nene Y.L. and Sheila V.K. (1990). *Pigeonpea* : geography and importance. In: Nene YL, Hall SD, Sheila VK (eds) *The Pigeonpea* . CAB, Wallingford, UK. 1–15.
- Newbury J. and Ford-Lloyd B. (1999). The production of user-friendly molecular marker for studying plants. *Biotechnol. News* 40: 5-6.
- Nunome T., Suwabe K., Iketani H. and Hirai M. 2003. Identification and characterization of microsatellite in eggplant. *Plant Breed* 122: 256-262.
- Odeny D.A., Jayashree B., Ferguson M., Hoisington D., Crouch J. and Gebhardt C. (2007). Development, characterisation and utilisation of microsatellite markers in *pigeonpea* [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Plant Breeding* 126: 130-137.
- Ohri D., Jha S.S. and Kumar S. (1994). Variability in nuclear DNA content within *pigeonpea* . *Plant Syst Evol* 189: 211–216.
- Ouedraogo M. (2003). Etude de la variabilité génétique et du flux de gènes chez des populations sauvages de *Phaseolus lunatus*. L. dans le val central du Costa Rica à l'aide des marqueurs enzymatiques et microsatellites. Thèse du doctorat FSAGX, Gembloux, Belgique.
- Painting K.A., Perry M.C., Denning R.A. and Ayad W.G. (1993). Guide de Documentation des Ressources Génétiques: Méthode d'autoformation pour la compréhension, l'analyse et l'utilisation de la documentation des ressources génétiques.  
([http://pdf.dec.org/pdf\\_docs/Pnach898.pdf](http://pdf.dec.org/pdf_docs/Pnach898.pdf))
- Palacios G., Bustamante S., Molina C., Winter P. and Kahl G. (2002). Electrophoretic identification of new genomic profiles with a modified selective amplification of microsatellite polymorphic loci technique based on AT/AAT polymorphic repeats. *Electrophoresis* 23: 3341-3345.
- Parani M., Lakshmi M., Senthilkumar P. and Parida A. (2000). Ribosomal DNA variation and phylogenetic relationships among *Cajanus cajan* (L.) Millsp. and its wild relatives. *Curr Sci* 78: 1235–1238.

- Peakall R. and Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetics analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Peleman, J. D., and J. R. Van Der Voort. (2003). Breeding by design. *Trends Plant Sci.* 8: 330–334.
- Polans N. O. and Allard R. W. (1989). An experimental evaluation of the recovery potential of ryegrass populations from genetic stress resulting from restriction of population size. *Evolution* 43 (6):1320-1324.
- Powell W., Machray G.C. and Provan J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1: 215-222.
- Pundir R.P.S. and Singh R.B. (1986). Karyotype analysis of *Cajanus*, *Atylosia* and *Rhynchosia* species. *Theor Appl Genet* 72:307–313.
- Pupko T. and Graur D. (1999). Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Role of length and number of repeated units. *J Mol Evol* 48: 313-316.
- Rachie K.O. and Roberts L.M. (1974). Grain legumes of the lowland tropics. *Adv Agron* 26: 1-32.
- Raijmann L.E.L., Van Leeuwen N.C., Kersten R., Oostermeijer J.G.B., Den Nijs J.C.M. and Menken S.B.J. (1994). Genetic Variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conserv Biol* 8(4): 1014-1026.
- Rallo P., Dorado G. and Martin A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 101: 984-989.
- Rao S.C., Coleman S.W. and Mayeux H.S. (2002). Forage production and nutritive value of selected pigeonpea ecotypes in the southern great plains. *Crop Sci* 42: 1259-1263.
- Ratnaparkhe M.B. and Gupta V.S. (2007). Pigeonpea in Pulses, Sugar and Tuber Crops. C. Kole. 306pp.
- Reddy L.J. and Faris D.G. (1981). A cytoplasmic-genetic male sterile line in pigeonpea. *Int Pigeonpea Newslett* 1: 16–17.
- Reddy M.V., Raju T.N. and Sheila V.K. (1996). Phytophthora blight resistance in wild pigeonpea. *ICPN* 3: 52-53.
- Reynolds, J.B., Weir B.S. and Cockerham C.C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767-779.
- Ribaut J.-M. and Hoisington D. (1998). Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3: 236-239.
- Romesburg H.CH. (1984) Cluster analysis for researchs. Wadsworth Inc. EEUU. 334pp.
- Saal B. and Wricke G. (1999) Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome*. 42 (5):964-972.
- Sado, T. (2008) Module 4: gestion de la fertilité du sol à travers les techniques de jachères améliorées Yaoundé, Cameroun : World Agroforestry Centre ICRAF . 10pp.

- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Saxena K.B., Reddy L.J., Singh L., Kumar R.V. and Faris D.G. (1998). Registration of ICPL 87154, a partially cleistogamous *pigeonpea* germplasm with low natural out-crossing. *Crop Sci* 38: 556.
- Saxena K.B., Kumar R.V. and Rao P.V. (2002). *Pigeonpea* nutrition and its improvement. In: Basra A.S., Randhawa I.S. (eds), *Quality Improvement in Field Crops*. Food Products Press. 227-260.
- Saxena K.B., Rao A.N., Singh U. and Remanandan P. (1996). Intraspecies variation in *Cajanus platycarpus* for some agronomic traits and crossability. *ICPN* 3: 49-51.
- Saxena K.B. and Sharma D. (1990). Pigeonpea genetics. In: Nene YL, Hall SD, Sheila VK (eds) *The Pigeonpea*. CAB, Wallingford, UK, pp 137-157.
- Saxena K.B., Singh L. and Gupta M.D. (1990). Variation for natural out-crossing in pigeonpea. *Euphytica* 46: 143-148.
- Saxena K.B. and Kumar R.V. (2003). Development of a cytoplasmic nuclear male sterility system in *pigeonpea* using *C. scarabaeoides* (L.) Thouars. *Ind J Genet* 63(3): 225-229.
- Schorderet D.F. and Gartlar S.M. (1992). Analysis of CpG suppression in non-methylated species. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 957-961.
- Sharma H.C., Pampapathy G. and Reddy L.J. (2003). Wild relatives of *pigeonpea* as a source of resistance to the pod fly (*Melanogromyza obtuse* Malloch) and pod wasp (*Tanaostigmodes cajaninae* La Salle). *Genet Resour Crop Evol* 50: 817-824.
- Singh U. and Jambunathan R. (1981). Protease inhibitors and in vitro protein digestibility of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L) Millsp.) and its wild relatives. *J Food Sci Technol* 18: 246-247.
- Sinha S.K. (1977). Food legumes: distribution, adaptability and biology of yield, p. 1-102. In: *FAO plant production and protection paper 3*. FAO, Rome.
- Sivaramakrishnan S., Seetha K. and Reddy L.J. (2002). Diversity in selected wild and cultivated species of pigeonpea using RFLP of mtDNA. *Euphytica* 125: 21-28.
- Slatkin M. (1985) Gene flow in natural populations. *Ann Rev Ecol Syst* 16: 393-430.
- Smulders M.J.M., Bredemeijer G., Rus-Kortekaas W., Arens P. and Vosman B. (1997). Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet* 97: 264-272.
- Sokal R.R., Michener M. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull* 28: 1409-1438.

- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co: New York. 887 pp.
- Song Q.J., Marek L.F., Shoemaker R.C., Lark K.G., Concibido V.C., Delannay X., Specht J.E. and Cregan P.B. (2004). A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theor Appl Genet* 109: 122-128.
- Souframanien J., Manjaya J.G., Krishna T.G. and Pawar S.E. (2003). Random amplified polymorphic DNA analyses of cytoplasmic male sterile and male fertile *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Euphytica* 129: 293-299.
- Squirrel J., Hollingsworth P.M., Woodhead M., Russell J., Lowe A.J., Gibby M. and Powell W. (2003). How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?. *Mol Ecol* 12: 1339-1348.
- Stajner N., Jakse J., Kozjak P. and Javornik B. (2005). The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Sci* 168: 213-221.
- Structure (version 2.2). Pritchard, Stephens et Donnelly 2000, Falush, Stephens et Pritchard 2003, 2007.
- Subbarao G.V., Johansen C., Jana M.K. and Kumar Rao J.V.D.K. (1991). Comparative salinity responses among *pigeonpea* accessions and their relatives. *Crop Sci* 31: 415-418.
- Tang S., Yu J.-K., Slabaugh M.B., Shintani D.K. and Knapp S.J. (2002). Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor Appl Genet* 105: 1124-1136.
- Tautz D. and Rentz P. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genome. *Nucleic Acids Res.* 12: 4127-4138.
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S. and McCouch S. (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genet Res* 11: 1441-1452.
- Tikka S.B.S., Parmar L.D. and Chauhan R.M. (1997). First record of cytoplasmic-genic male sterility system in *pigeonpea* (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) through wide hybridization. *Gujarat Agric Univ Res J* 22(2): 160-162.
- Troedson R.J., Wallis E.S. and Singh L. (1990). Pigeonpea : adaptation. In: Nene Y, Hall SD, Sheila VK (eds), *The Pigeonpea*. CABI, Wallingford. 159-177.
- Upadhyaya H.D., Pundir R.P.S., Gowda C.L.L., Reddy K.N. and Singh S. (2005). Geographical patterns of diversity for qualitative and quantitative traits in the *pigeonpea* germplasm collection. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 3: 331-352 Cambridge University Press.

- Upadhyaya H.D., Reddy K.N., Sastry D.V. and Gowda C.L.L. (2007). Identification of photoperiod insensitive sources in the world collection of pigeonpea at ICRISAT. An Open Access Journal 3 (1). [http://www.icrisat.org/Journal/chickpea\\_pigeonpea3.htm](http://www.icrisat.org/Journal/chickpea_pigeonpea3.htm)
- Van der Maesen, L.J.G. (1985). *Cajanus* DC. and *Atylosia* W.& A. (Leguminosae). A revision of all taxa closely related to the pigeonpea, with notes on other related genera within the subtribe *Cajaninae*. (En). Wageningen Papers 85-4. Wageningen, The Netherlands: Agricultural University. 225 pp.
- Van der Maesen L.J.G. (1990). Pigeonpea : origin, history, evolution and taxonomy. In: Nene YL, Hall SD, Sheila VK (eds), *The Pigeonpea*. CABI, Wallingford, UK. 15-46.
- Verschueren J. (1992). Estudio Morfológico y Taxonomico para la Region Grau. CIPCA. 79pp.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M. and Eggen A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34: 275-305.
- Wanjari K.B., Patil A.N., Manapure P., Manjappa J.G. and Manish P. (2001). Cytoplasmic male sterility in *pigeonpea* with cytoplasm from *Cajanus volubilis*. *Ann Plant Physiol* 13: 170–174.
- Weir B.S. and Cockerham C.C., (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weir B.S. (1996). *Genetic Data Analysis* (Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 445pp.
- Wright S. (1978). *Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press. Chicago. USA. 580 pp.
- Wutke E.B. (1987). Caracterização fenológica e avaliação agronômica de genótipos de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. 164pp.
- Yaish M.W.F. and de la Vega M.P. (2003). Isolation of (GA)<sub>n</sub> Microsatellite Sequences and Description of a predicted MADS-box sequence isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genet Mol Biol* 26: 337-342.
- Zane L., Bargelloni L. and Patarnello T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11: 1-16.
- Zeven A.C. (1998). Landraces: A review of definitions and classifications. *Euphytica* 104 (2): 127–139.
- Zhao Q. F., Wang G., Li Q., Shi-Rong Ma, Cui Y. and Grillo M.(2006). Genetic diversity of five *Kobresia* species along the eastern Qinghai-Tibet plateau in China. *Hereditas*. 143: 33-40.





**Annexe 1** : Caractérisation morphologique qualitative de la collection. Moyenne de 20 plantes.

N°	Population	HC	TF	IB	PT	FF	PCA	CCO	CG	CSG	FG	PG	FGS	CGS	CSG
1	Illimo 1	érigé	déterminé	compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	rose obs	type_A	droite	cylindrique	elliptique	beige clair	points marron
2	Illimo2	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_c	A	grenat	type_A	droite	cylindrique	elliptique	beige clair	points marron
3	Illimo4	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_c	RO	rose obs	type_A	mojarra	plat	elliptique	beige clair	points marron
4	Morrope 9	érigé	déterminé	compact	vert jaune	lancéolé	type_b	ETN	rose obs	type_B	poisson	plat	circulaire	beige clair	points marron
5	Morrope 11	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	grenat	type_B	mojarra	plat	circulaire	beige rose	points marron
6	Morrope 12	érigé	indéterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	vert	type_A	mojarra	plat	elliptique	beige clair	taches marron
7	Morrope 22	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	rose obs	type_A	curvée	plat	circulaire	Crème	points marron
8	Jayanca 23	érigé	indéterminé	semi-compact	vert jaune	lancéolé	type_b	ETN	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron
9	Jayanca 24	érigé	indéterminé	compact	vert rouge	lancéolé	type_b	ETN	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	sans pig
10	Jayanca 26	érigé	déterminé	compact	vert jaune	oblongue	type_c	RG	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron
11	Morrope 28	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	sans pig
12	Morrope 30	érigé	indéterminé	ouvert	vert jaune	oblongue	type_b	EPN	grenat	type_B	mojarra	plat	circulaire	beige rose	taches marron
13	Morrope 34	érigé	indéterminé	semi-compact	vert jaune	lancéolé	type_b	A	vert	type_A	droite	cylindrique	elliptique	beige clair	sans pig
14	Morrope 37	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	lancéolé	type_b	ETN	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige rose	points marron
15	Motupe 40	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_c	RO	rose obs	type_A	mojarra	plat	elliptique	beige rose	points marron
16	Motupe 44	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	grenat	type_B	mojarra	plat	circulaire	beige clair	points marron
17	Motupe 45	érigé	indéterminé	ouvert	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige rose	sans pig
18	Oimos 47	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_a	RT	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige rose	taches marron
19	Oimos 48	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	rose obs	type_A	curvée	plat	elliptique	beige clair	points marron
20	Oimos 49	Incliné	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_a	RT	vert	type_A	mojarra	plat	circulaire	beige clair	sans pig
21	Oimos 52	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	EPN	grenat	type_C	droite	plat	elliptique	beige clair	points marron
22	Oimos 54	érigé	indéterminé	ouvert	vert rouge	oblongue	type_b	ETN	vert	type_A	mojarra	plat	elliptique	crème	points marron
23	Is 10	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	A	vert	type_A	droite	plat	elliptique	crème	points marron
24	Promptex	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_c	RG	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron
25	Var. Indienne	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron

**Annexe 2** : Caractérisation morphologique qualitative de la collection. Moyenne de 20 plantes.

N°	Population	HC	TF	IB	PT	FF	PCA	CCO	CG	CSG	FG	PG	FGS	CGS	CSG
1	Illimo 1	111	121	131	141	211	312	323	412	421	431	512	711	722	733
2	Illimo2	111	121	132	141	211	313	321	413	421	431	512	711	722	733
3	Illimo4	111	121	132	141	211	313	323	412	421	434	511	711	722	733
4	Morrope 9	111	121	131	141	213	312	325	412	422	435	511	712	722	733
5	Morrope 11	111	121	132	141	211	312	325	413	422	434	511	712	723	733
6	Morrope 12	111	122	132	141	211	312	325	411	421	434	511	711	722	732
7	Morrope 22	111	121	132	141	211	312	323	412	421	432	511	712	723	733
8	Jayanca 23	111	122	132	141	213	312	325	413	423	431	512	712	722	733
9	Jayanca 24	111	122	131	142	213	312	325	411	421	431	512	712	722	731
10	Jayanca 26	111	121	131	141	211	313	324	413	423	431	512	712	722	733
11	Morrope 28	111	121	132	141	211	312	325	411	421	431	512	712	722	731
12	Morrope 30	111	122	133	141	211	312	326	413	422	434	511	712	723	732
13	Morrope 34	111	122	132	141	213	312	321	411	421	431	512	711	722	731
14	Morrope 37	111	121	132	141	213	312	325	411	421	431	512	712	723	733
15	Motupe 40	111	121	132	141	211	313	323	412	421	434	511	711	723	733
16	Motupe 44	111	121	132	141	211	312	325	413	422	434	511	712	722	733
17	Motupe 45	111	122	133	141	211	312	325	411	421	431	512	712	723	731
18	Omos 47	111	121	132	141	211	311	322	411	421	431	512	712	723	732
19	Omos 48	111	121	132	141	211	312	323	412	421	432	511	711	722	733
20	Omos 49	112	121	132	141	211	311	322	411	421	434	511	712	722	731
21	Omos 52	111	121	132	141	211	312	326	413	423	431	511	711	722	733
22	Omos 54	111	122	133	142	211	312	325	411	421	436	511	713	721	733
23	Is 10	111	121	132	141	211	312	321	411	421	431	511	713	721	733
24	Pompex	111	121	132	141	211	313	324	413	423	431	512	712	722	733
25	Var Indienne	111	121	132	141	211	312	323	413	423	431	512	712	722	733

**Annexe 3 : Caractérisation morphologique qualitative de la collection. Moyennes de 5 plantes (phytoPASS).**

N°	Population	HC	TF	IB	PT	FF	PCA	CCO	CG	CSG	FG	PG	FCS	CGS	CSG
1	Illimo 1	érigé	déterminé	compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	rose obs	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron
2	Illimo2	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	A	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron
3	Illimo4	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_c	RO	rose obs	type_A	mojarra	plat	circulaire	beige clair	points marron
4	Morrope 9	érigé	déterminé	compact	vert jaune	lancéolé	type_b	ETN	rose obs	type_B	poisson	plat	circulaire	beige clair	points marron
5	Morrope 11	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	grenat	type_B	mojarra	plat	circulaire	beige rose	points marron
6	Morrope 12	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_a	ETN	vert	type_A	mojarra	plat	circulaire	beige rose	taches marron
7	Morrope 22	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	rose obs	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige rose	points marron
8	Jayanca 23	érigé	indéterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	grenat	type_A	droite	plat	circulaire	beige clair	points marron
9	Jayanca 24	érigé	indéterminé	compact	vert rouge	lancéolé	type_b	ETN	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	sans pig
10	Jayanca 26	érigé	déterminé	compact	vert jaune	oblongue	type_c	RG	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	taches marron
11	Morrope 28	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	sans pig
12	Morrope 30	érigé	indéterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	EPN	grenat	type_B	mojarra	plat	circulaire	beige rose	taches marron
13	Morrope 34	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	grenat	type_B	droite	cylindrique	elliptique	beige clair	sans pig
14	Morrope 37	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	lancéolé	type_b	RG	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige rose	taches marron
15	Motupe 40	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	rose obs	type_A	mojarra	plat	circulaire	beige rose	taches marron
16	Motupe 44	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	rose obs	type_B	mojarra	plat	circulaire	beige rose	taches marron
17	Motupe 45	érigé	indéterminé	ouvert	vert jaune	oblongue	type_b	ETN	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige rose	sans pig
18	Olnos 47	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_a	RT	vert	type_A	droite	cylindrique	circulaire	beige rose	taches marron
19	Olnos 48	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	rose obs	type_A	curvée	plat	circulaire	beige clair	points marron
20	Olnos 49	Incliné	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_a	RT	vert	type_A	mojarra	plat	circulaire	beige clair	sans pig
21	Olnos 52	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	EPN	grenat	type_C	droite	plat	elliptique	beige clair	points marron
22	Olnos 54	érigé	indéterminé	ouvert	vert rouge	oblongue	type_b	ETN	vert	type_A	falçada	plat	elliptique	crème	taches marron
23	Is 10	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	A	vert	type_A	droite	plat	elliptique	crème	points marron
24	Prompex	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_c	RG	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron
25	Var. Indienne	érigé	déterminé	semi-compact	vert jaune	oblongue	type_b	RO	grenat	type_C	droite	cylindrique	circulaire	beige clair	points marron

**Annexe 4** : Caractérisation morphologique qualitative de la collection. Moyennes de 5 plantes (*phytoPASS*) par accession.

N°	Population	HC	TF	IB	PT	FF	PCA	CCO	CG	CSG	FG	PG	FGS	CGS	CSG
1	Illimo 1	111	121	131	141	211	312	323	412	421	431	512	712	722	733
2	Illimo2	111	121	132	141	211	312	321	411	421	431	512	712	722	733
3	Illimo4	111	121	132	141	211	313	323	412	421	434	511	712	722	733
4	Morrope 9	111	121	131	141	213	312	325	412	422	435	511	712	722	733
5	Morrope 11	111	121	132	141	211	312	325	413	422	434	511	712	723	733
6	Morrope 12	111	121	132	141	211	311	325	411	421	434	511	712	723	732
7	Morrope 22	111	121	132	141	211	312	323	412	421	431	512	712	723	733
8	Jayanca 23	111	122	132	141	211	312	323	413	421	431	511	712	722	733
9	Jayanca 24	111	122	131	142	213	312	325	411	421	431	512	712	722	731
10	Jayanca 26	111	121	131	141	211	313	324	413	423	431	512	712	722	732
11	Morrope 28	111	121	132	141	211	312	325	411	421	431	512	712	722	731
12	Morrope 30	111	122	132	141	211	312	326	413	422	434	511	712	723	732
13	Morrope 34	111	121	132	144	217	316	325	413	422	431	512	711	722	731
14	Morrope 37	111	121	132	141	213	312	324	413	423	431	512	712	723	733
15	Motupe 40	111	121	132	141	211	312	323	412	421	434	511	712	723	733
16	Motupe 44	111	121	132	141	211	312	325	412	422	434	511	712	723	733
17	Motupe 45	111	122	133	141	211	312	325	411	421	431	512	712	723	731
18	Omos 47	111	121	132	141	211	311	322	411	421	431	512	712	723	732
19	Omos 48	111	121	132	141	211	312	323	412	421	432	511	712	722	733
20	Omos 49	112	121	132	141	211	311	322	411	421	434	511	712	722	731
21	Omos 52	111	121	132	141	211	312	326	413	423	431	511	711	722	733
22	Omos 54	111	122	133	142	211	312	325	411	421	436	511	713	721	732
23	Is 10	111	121	132	141	211	312	321	411	421	431	511	713	721	733
24	Prompex	111	121	132	141	211	313	324	413	423	431	512	712	722	733
25	Var Indienne	111	121	132	141	211	312	323	413	423	431	512	712	722	733